

**Efectos de la temperatura sobre el peso seco, concentración de
aceite y la proporción de ácidos grasos en el aceite de frutos
de olivo**

(Olea europaea L. var `Arauco`)

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agrarias*

Georgina Paula García Inza

Ing. Agrónoma Universidad de Buenos Aires -2010

Lugar de trabajo: CRILAR-CONIET



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

María Cecilia Rousseaux

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Antonio Juan Hall

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Ph.D. (Biological Sciences), Macquarie University, Australia

JURADO DE TESIS

María Cecilia Rousseaux

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Damián Modesto Maestri

Biólogo (Universidad Nacional de Córdoba)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Córdoba)

JURADO

Hava Rapoport Goldberg

B. A. in Biology (University of California at Santa Cruz)

Ph. D. in Botany (University of California at Davis)

JURADO

Natalia Gabriela Izquierdo

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Doctora en Ciencias Agrarias y Magister Scientiae (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Fecha de defensa de la tesis: 5 de marzo de 2015

Agradecimientos

A mi directora María Cecilia Rousseaux y a Peter Searles por abrirme la puerta a su grupo de trabajo, a Cecilia por su ayuda en los experimentos y análisis de datos. A Antonio Hall por compartir su conocimiento, experiencia y consejos. Por su predisposición y colaboración en todo momento

Al Ing. Diego Castro, quién con infinita paciencia ayudó en distintas instancias del trabajo, por su dedicación, entusiasmo y generosidad. Además permitió que el experimento se coloque en su finca. También agradezco a su familia (Cecilia, Guada, Leo y a la tía Nita) que siempre me recibieron con los brazos abiertos y permitieron que el jardín de su casa se convierta en un campo experimental.

Al grupo olivo: “la Vale” Albarracín, Daniel Martínez, Martín Agüero, Silvana Hoffmann por su compañerismo y amistad. Agradezco los momentos de trabajo, sus consejos y las risas compartidas. También a los técnicos de campo que ayudaron a mantener los experimentos en condiciones por largos períodos: Eduardo Barbero, Andrés “Moneda” Herrera y Franco Guerrero.

La realización de la tesis de doctorado me tomo 5 años en los que además del apoyo científico y técnico tuve el apoyo de la familia y amigos. Especialmente agradezco a mis padres, Mónica y Jorge, a mi hermano Mariano por su apoyo incondicional. A mis abuelas, Elisa y Yolanda. A Facu Ventura, mi compañero de la vida durante este período de tanto aprendizaje intelectual y espiritual. A mis ahijadas Isabella y Catalina Sorlino, por compartir su alegría, por su felicidad contagiosa, gracias nenas. A mis amigas Chechi Fernández Silva, Lucia Barriga y Jesi Barneto por estar siempre, por escucharme, por acompañarme, incluso hasta La Rioja. A Pablo García-Parisi y Agustín Repetto, por su amistad, por escuchar, acompañar.

Por último agradezco al CONICET, al Ministerio de Ciencia y Técnica de la Nación por financiar mi formación doctoral y los experimentos que realicé. Estoy agradecida a las políticas nacionales que impulsaron y revalorizaron en Argentina la formación de doctores de la que pude ser parte.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Georgina Paula García Inza

ÍNDICE GENERAL

Resumen	xv
Abstract	xvii
Capítulo I.....	19
Introducción General	19
Capítulo I.....	21
Introducción General	21
1.1 Marco conceptual	21
1.2. El efecto de la temperatura sobre el peso seco del fruto.....	23
1.3. Efecto de la temperatura explorada durante el crecimiento del fruto sobre la concentración de aceite.....	24
1.2. La temperatura como modulador de la composición de ácidos grasos presentes en el aceite de frutos de olivo.....	25
1.3. Variación diferencial en la composición acídica del aceite sintetizado en semilla y mesocarpo según las temperaturas exploradas durante el crecimiento del fruto.....	27
1.5. Ciclo diario luz/oscuridad: efecto del momento en que ocurren las altas temperaturas sobre la composición de ácidos grasos del aceite del fruto.....	30
1.6. Resumen	31
1.7. Objetivos e Hipótesis.....	32
1.8. Estructura de la tesis	33
Capítulo II.....	37
Efecto de la temperatura sobre el peso seco del fruto, la concentración de aceite, y la proporción de ácidos grasos en el aceite de oliva (<i>Olea europaea</i> L. var. 'Arauco')	37
2.1. Introducción.....	37
2.2. Métodos	39
2.2.1. Sitio experimental y tratamientos de temperatura	39
2.2.2. Los sistemas de calefacción y refrigeración.	42
1.1.3. Variables de respuesta	43
1.1.4. Mediciones y experimentos complementarios.....	44
1.1.5. Análisis estadísticos.....	44
2.3. Resultados.....	45
2.3.1. La temperatura ambiente y la temperatura de los experimentos	45
1.2.4. Dinámica estacional de crecimiento del fruto en las ramas no tratadas	49

1.2.6. Efecto de la temperatura en el experimento de <i>un mes de duración</i> y la respuesta post tratamiento.....	54
2.4. Discusión.....	57
Capítulo III.....	63
Efectos de la temperatura sobre el peso seco, la concentración de aceite y la proporción de ácidos grasos de los aceites de mesocarpio y la semilla de olivo (<i>Olea europaea</i> L. var. 'Arauco').	63
3.1. Introducción	65
3.2. Métodos.....	67
3.2.1. Sitio experimental y tratamientos de temperatura.....	67
3.2.2. Los sistemas de calefacción y refrigeración.....	68
3.3. Resultados	69
3.3.1. Las temperaturas ambiente y en las cámaras de temperatura controlada.....	69
3.3.2. Dinámica de crecimiento estacional del mesocarpio y la semilla en ramas no tratadas	71
3.3.3. Peso seco y concentración de aceite en el mesocarpio y la semilla en respuesta a la temperatura.....	72
3.3.6. Respuestas a la temperatura del ácido oleico del aceite de mesocarpio y semilla ..	74
3.3.7. Respuesta a la temperatura de ácidos grasos proporcionalmente minoritarios en los aceites de semillas y mesocarpio.....	76
3.4. Discusión.....	79
Capítulo IV	83
Efecto de las distintas dimensiones del régimen térmico sobre el peso seco, concentración de aceite y proporción de ácidos grasos del aceite	83
4.1. Introducción	85
4.2. Métodos.....	87
4.2.1. Conducción de la plantación y diseño experimental.....	87
4.2.2. Tratamientos térmicos.....	88
4.2.3. Variables de respuesta registradas	88
4.2.4. Análisis estadístico.....	89
4.3. Resultados	89
4.3.1. Temperatura durante el experimento	89
4.3.2. Proporciones de biomasa y aceite por fruto acumulados durante el período de tratamiento.	91
4.3.3. Respuesta del peso seco del fruto, su contenido de aceite y la concentración de aceite a los tratamientos térmicos	92

4.3.4. Variación en la proporción de los principales ácidos grasos del aceite en respuesta a los tratamientos térmicos diurnos y nocturnos.....	95
6.3.5. Relaciones proporciones de ácidos grasos /Temperatura mínima media	97
6.3.6. Relaciones proporciones de ácidos grasos /Temperatura media	99
6.3.7. Relaciones proporciones de ácidos grasos /Amplitud térmica	101
4.4. Discusión	103
Capítulo V	107
Discusión general.....	107
Referencias Bibliográficas	116

Índice de cuadros

Cuadro 2.1. Duración del experimento, momento de aplicación, nivel térmico y temperatura media durante el tratamiento en el “*experimento de cuatro meses de duración*” y en el “*experimento de un mes de duración*”58

Cuadro 2.2. Efecto de la cámara y de la tela media sombra sobre el peso seco del fruto (g), la concentración de aceite (%) y la proporción de ácido oleico (%). Las ramas fructíferas crecieron en tres condiciones distintas: dentro de cámaras (iguales a las descritas para los experimentos *de un mes o de cuatro meses de duración*), fuera de la cámara pero con tela media sombra (de 30% de transmitancia) ó en condiciones lumínicas naturales. El tratamiento se aplicó entre el 1 de marzo y 10 de mayo de 2011. Los valores son promedios \pm 1 SE (n=4). Estos datos corresponden al experimento complementario.....62

Cuadro 2.3. Funciones de ajuste entre las temperaturas y las proporciones de ácidos grasos en el aceite de oliva en frutos cosechados al final de la estación de crecimiento. El tratamiento se inició 30 días después de endurecimiento del endocarpo, entre el 19 de enero y el 13 de mayo de 2010 (cosecha). Datos correspondientes al *experimento de cuatro meses de duración*.66

Cuadro 2.4 Respuesta a la temperatura del peso seco del fruto, concentración de aceite y proporción de ácidos grasos a cosecha final (13 de Mayo). El aumento de temperatura fue en el rango de 6.2 a 7.3 °C (tratamiento T7+) según el período de 30 días en el que se aplicó el tratamiento. Las ramas estuvieron en las cámaras termostatzadas por un mes, luego crecieron a temperatura ambiente hasta la cosecha final. T0 corresponde al tratamiento control. El período Enero- Febrero se inició 24 días después del endurecimiento de endocarpo. Los valores son promedio \pm 1SE (n=4). Las letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos en cada periodo. Información del tratamiento de *un mes de duración*71

Cuadro 4.1. Temperatura media, temperatura máxima media, mínima media y amplitud térmica de los tratamientos aplicados entre el 7 de febrero y el 24 de abril de 2013. Los niveles térmicos aplicados fueron: Control (T0), dos niveles de calentamiento diurno: D5+ y D10+ (5 y 10°C más que T0, entre las 8 y las 20h) y 2 niveles de calentamiento nocturno: N5+ y N10+ (5 y 10°C más que T0, entre las 20 y 8h). Los valores representan la media \pm 1 S.E (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos térmicos ($P < 0.05$)......116

Cuadro 4.2. Peso seco de los frutos y su contenido de aceite a cosecha final (24 de abril de 2013) (los valores son medias \pm un S.E y contribución (%) al valor final de la biomasa y el aceite acumulado durante el período de tratamiento. Las letras diferentes en las columnas “peso seco del fruto” y “contenido de aceite” indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$)......118

Cuadro 4.3. Coeficientes de determinación y niveles de significancia de las regresiones simples entre variables de respuesta y dimensiones motrices candidatas del régimen térmico (medias diarias para el período de tratamiento).....120

Índice de Figuras

Figura 1.1. Proporción de ácido oleico en el aceite de oliva extraído de frutos que crecieron distintas localidades del NOA en función de la temperatura media. La temperatura es el promedio de los 5 meses que duró la acumulación de aceite (diciembre- abril). Cada punto es el promedio de la concentración de oleico en cada año por localidad, los años de muestreo abarcaron entre 2005-2008, aunque no toda las localidades tienen los 3 años de repetición. Figura adaptada de Rondanini et al., 2011.....26

Figura 1.2. Dinámica del incremento del peso fresco del fruto del olivo desde floración (día cero) a madurez del fruto. Los intervalos indican las subfases del crecimiento del fruto. Durante la subfase I ocurre la fertilización de las flores y cuaje de los frutos, en la sub subfase II principalmente ocurre el crecimiento de la semilla. La subfase III corresponde a la esclerificación del endocarpo (EE), seguido del crecimiento del mesocarpo (IV) y la maduración (V). Figura adaptada de Conde et al. (2008).....34

Figura 2.1. (a) Temperatura media diaria del ambiente durante el período de tratamiento en el “*experimento de cuatro meses de duración*” (2010) y en el “*experimento de un mes de duración*” (2009). (b) Temperatura media diaria de las cámaras durante el período de tratamiento del “*experimento de cuatro meses de duración*” (19 de enero a 13 de mayo, 2010). Los tratamientos aplicados fueron: control (T0), enfriamiento (T4-, 4 °C menos que T0) y dos niveles de calentamiento (T5+ y T10+, 5 y 10 °C más que T0 respectivamente). (c) Temperatura media diaria de las cámaras durante los períodos de tratamiento en el “*experimento de un mes de duración*” (13 de enero al 19 de mayo, 2009, delimitados con las líneas horizontales). Los tratamientos fueron control (T0), calentamiento (T7+; 6 a 7.3 °C más que T0). Cada punto representa la media (n=4), S.E no se muestra con el fin de clarificar la figura.60

Figura 2.2. Marcha de la temperatura diaria en las cámaras para el 7 de febrero de 2010 en el “*experimento de cuatro meses de duración*”. Los tratamientos aplicados fueron: control (T0), enfriamiento (T4-, 4 °C menos que T0) y dos niveles de calentamiento (T5+ y T10+, 5 y 10 °C más que T0 respectivamente). Cada punto representa el promedio (n=4), S.E no se muestra con el fin de clarificar la figura.....62

Figura 2.3. Peso seco del fruto, concentración de aceite (%) y proporción de ácido oleico (%) en función de los días después de endurecimiento del endocarpo en *Olea europaea* L. var. Arauco (el cero corresponde al día que se registró el endurecimiento de carozo, 24 de diciembre de 2010) en el “*experimento de cuatro meses de duración*”. Los frutos se cosecharon de ramas sin tratar, pero en los mismos árboles y seleccionando tamaños y posiciones similares a las tratadas. Los símbolos son promedios ± 1 S.E (n= 4), S.E.s no se muestran cuando son más pequeños que el símbolo.....63

Figura 2.4. Peso seco a cosecha final (a) y concentración de aceite (b) en función de la temperatura media durante el *experimento de cuatro meses de duración*. Los tratamientos fueron: control (T0, ■), enfriamiento (T4-, ▲) y dos niveles de calentamiento (T5+, ● y T10+, ♦). Cada valor corresponde a una cámara con control individual de temperatura65

Figura 2. 5. Concentración de ácido oleico (a), ácidos palmítico y linoleico (b) y ácidos palmitoleico, esteárico y linolénico (c) en función de la temperatura media durante el *experimento de cuatro meses de duración*. Los tratamientos fueron: control (T0, ■), enfriamiento (T4-; ▲) y dos niveles de calentamiento (T5+, ●; y T10+, ◆). Cada valor corresponde a una cámara con control individualizado de temperatura. Las funciones ajustadas se especifican en el Cuadro 2.2.....68

Figura 2. 6. Efecto del incremento de la temperatura (6-7 °C sobre la temperatura T0) durante los períodos de *un mes de duración* sobre el peso seco del fruto (a), la concentración de aceite (%) (b) y la concentración de ácido oleico (%) (c) de los frutos. La cosecha se realizó al retirar el tratamiento de *un mes de duración* en cada período. Los tratamientos fueron control (T0) y calentamiento (T7+), se aplicaron entre enero y mayo de 2009 (desde 24 a 147 DDEE). Las líneas punteadas indican los valores al inicio del período tratado. Las barras son promedio y las líneas verticales representa 1 S.E (n=4). Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (P<0.05) entre los tratamientos dentro de un período. Estos datos corresponden al *experimento de un mes de duración*.....70

Figura 3.1. Temperaturas medias diarias de las cámaras durante la aplicación del tratamiento en el período A (25 noviembre 2010 hasta 23 febrero 2011) y el período B (marzo 1-mayo 10, 2011). Los tratamientos fueron: control (T0 ● y línea continua), refrigeración (T3-□; 3 ° C más fría que T0), y dos niveles de calefacción (T5 + Δ y T10 + ◇, 5 y 10 ° C mayor que T0, respectivamente). Las líneas horizontales indican los períodos de tratamiento. Cada punto representa la media (n = 4), los valores de S.E no se muestran para lograr mayor claridad de la figura.....88

Figura 3.2. Marcha diaria de la temperatura para los cuatro niveles térmicos para el día 20 de febrero de 2011. Cada punto representa la temperatura media horaria. Los niveles térmicos fueron: control (T0 ●), enfriamiento (T3-□; 3 ° C más fría que T0), y dos niveles de calefacción (T5 + Δ y T10 + ◇, 5 y 10 ° C mayor que T0, respectivamente).....91

Figura 3.3. (a) Peso seco del mesocarpio, endocarpio y semilla, (b) concentración de aceite en mesocarpio y semilla (%) en función del tiempo (días después de endurecimiento del endocarpio) en *Olea europaea* L. var. 'Arauco' (el cero corresponde a la fecha de endurecimiento del endocarpio, 30 de diciembre de 2011). Los frutos fueron cosechados de ramas no tratadas pero de características y posición similares a las tratadas. Las líneas horizontales indican los períodos de tratamiento (A: -21 a 50 días de endurecimiento del endocarpio y B: 56-130 días después del endurecimiento del endocarpio). Los símbolos representan las medias (n = 4) ± un S.E y los S.E no se muestran cuando resultan más pequeños que el símbolo92

Figura 3.4. Peso seco del mesocarpio (a, b) y concentración de aceite (c, d) en el mesocarpio en función de la temperatura media durante los períodos A (a, c) y B (b, d) (25 de noviembre 2010 al 23 de febrero de 2011 y marzo 1 hasta mayo 10 2011, respectivamente). Las variables de respuesta en el período B se estimaron sobre la biomasa y aceite acumulados durante ese período. Los tratamientos fueron: control (T0 ●), refrigeración (T3-□; 3 ° C más que T0), y dos niveles de calefacción (T5 + ▼ y T10 + ◇, 5 y 10 ° C menos que T0, respectivamente). Cada punto es el valor de una cámara con control de temperatura individual. Las flechas horizontales cruzados por una barra vertical que apuntan al eje "y" en los paneles b y d indican los valores de peso seco y concentración de aceite promedio ± 1 S.E al inicio del período B.....94

Figura 3. 5. Peso en seco de la semillas (a, b) y concentración de aceite en la semilla (c, d) al final de cada período de tratamiento en función de la temperatura media durante el período A (a, c) y B (b, d) (25 noviembre 2010 a 23 febrero 2011 y 1 marzo a 10 mayo 2011, respectivamente). Los tratamientos fueron: control (T0 ●), refrigeración (T3-□; 3 ° C más T0), y

dos niveles de calefacción ($T5 + \blacktriangledown$ y $T10 + \diamond$, 5 y 10 ° C menos $T0$, respectivamente). Cada punto es el valor de una cámara con control de temperatura individual. Las líneas de regresión en b y d no fueron estadísticamente significativas, pero se incluyen para ilustrar la falta de respuesta. Las flechas horizontales cruzadas por una barra vertical que apuntan al eje “y” en los paneles b y d indican los valores de peso seco y concentración de aceite promedio ± 1 S.E al inicio del período B.....95

Figura 3.6. Contenido de ácido oleico del aceite de mesocarpio (%) al final del período de tratamiento en función de la temperatura media durante cada uno de los períodos A (a) y B (b) (noviembre 25, 2010 a febrero 23, 2011 y el 1 de marzo al 10 de mayo 2011 respectivamente). Los paneles inferiores muestran el contenido de ácido oleico (%) presente en el aceite de semilla en función de la temperatura media durante el período A (c) y B (d). Los tratamientos fueron: control ($T0 \circ$), refrigeración ($T3-\blacksquare$; 3 ° C menos que $T0$), y dos niveles de calefacción ($T5 + \blacktriangledown$ y $T10 + \diamond$, 5 y 10 ° C más $T0$, respectivamente). Cada punto es el valor de una cámara con control de temperatura individual. La línea de regresión en d no fue estadísticamente significativa, pero se muestra para ilustrar la falta de respuesta. Las flechas horizontales cruzadas por una barra vertical que apuntan al eje “y” en los paneles b y d indican los valores de la proporción de ácido oleico promedio ± 1 S.E al inicio del período B en mesocarpio y semilla respectivamente.....97

Figura 3.7. Respuesta de los ácidos grasos minoritarios del aceite de mesocarpio en los períodos A (paneles de la izquierda) y B (paneles de la derecha) a la temperatura media del período. Los tratamientos fueron: control ($T0 \circ$), refrigeración ($T3-\blacksquare$; 3 ° C menos que $T0$), y dos niveles de calefacción ($T5 + \blacktriangledown$ y $T10 + \diamond$, 5 y 10 ° C por arriba de $T0$, respectivamente). Cada punto es el valor de una cámara con temperatura controlada individualmente. Las líneas de regresión para el ácido esteárico en los paneles c y d no fueron estadísticamente significativas, pero se incluyen para ilustrar la ausencia de respuesta. Las flechas horizontales que apuntan al eje “y” en los paneles b y d indican los valores de la proporción de los ácidos grasos promedio (los valores de los S.E fueron bajos y no se pudieron graficar) al inicio del período B en mesocarpio.....98

Figura 3.8. Concentración de los ácidos grasos minoritarios presentes en la semilla en función de la temperatura media en los períodos A (paneles de la izquierda) y B (paneles de la derecha). Los tratamientos fueron: control ($T0 \circ$), refrigeración ($T3-\blacksquare$; 3 ° C menos que $T0$), y dos niveles de calefacción ($T5 + \blacktriangledown$ y $T10 + \diamond$, 5 y 10 ° C por arriba de $T0$, respectivamente). Cada punto es el valor de una cámara con temperatura controlada individualmente. Las líneas de regresión en b y d no fueron estadísticamente significativas, pero se incluyen para ilustrar la falta de respuesta. Las flechas horizontales cruzadas por una barra vertical que apuntan al eje “y” en los paneles b y d indican los valores de proporción de los ácidos grasos promedio ± 1 S.E al inicio del período B en el aceite de semilla.....100

Figura 4. 1. Ejemplo de patrón térmico diario para los tratamientos: control $T0 (\circ)$, calentamiento nocturno de 20-8h $N10+ (\blacktriangle)$ y calentamiento diurno de 8-20h $D10+ (\Delta)$. Los símbolos representan las medias y las líneas verticales 1 S.E ($n=4$). Los valores correspondientes a los tratamientos $D5+$ y $N5+$ no se incluyeron para facilitar la lectura de la figura, pero exhibieron patrones intermedios entre los del tratamiento control y los tratamientos $D10$ y $N10$, respectivamente. La marcha térmica graficada corresponde al 20 de febrero de 2013118

Figura 4.2. Incrementos de peso seco del fruto (A) y de contenido de aceite por fruto (B) durante el periodo de tratamiento (7 de febrero al 24 de abril de 2013) en función de la temperatura media diaria durante el período experimental. Los tratamientos fueron: control ($T0 \circ$), dos niveles de calentamiento diurno: $D5+ (\square)$ y $D10+ (\Delta)$, dos niveles de calentamiento nocturno: $N5+ (\blacksquare)$ y $N10+ (\blacktriangle)$. Cada punto representa el valor para una cámara de temperatura individualmente controlada123

Figura 4.3. Concentración de aceite en el fruto en función de la temperatura mínima media (a), de la máxima media (b) y de la amplitud térmica (diferencia entre la temperatura máxima y mínima diaria) (c) durante el período experimental. La concentración de aceite se calculó sobre los incrementos en peso seco y aceite durante el periodo de tratamiento (de 7 de febrero al 24 de abril de 2013). Los tratamientos fueron: control T0 (○), dos niveles de calentamiento diurno: D5+ (□) y D10+ (Δ), dos niveles de calentamiento nocturno: N5+ (■) y N10+ (▲). Cada punto representa el valor para una cámara de temperatura individualmente controlada125

Figura 4.4. Análisis de correspondencia de los principales ácidos grasos del aceite de oliva. El 87% de la variabilidad de la proporción de los ácidos grasos es explicada por los ejes (60.7% eje 1 y 26.4% el eje 2). Los vectores muestran las relaciones entre las variables motrices predictoras (temperatura media, máxima, mínima y amplitud térmica) en el “biplot” generado y los puntos las posiciones de las proporciones de ácidos grasos en el mismo espacio.....127

Figura 4.5. Variación en la proporción de ácido palmítico (a), esteárico (b), oleico (c), linoleico (d) y linolénico (e) en función de la temperatura mínima media durante el período de tratamiento. Los porcentajes fueron calculados sobre la base del aceite sintetizado durante el período de tratamiento. Los tratamientos fueron: control T0 (○), dos niveles de calentamiento diurno: D5+ (□) y D10+ (Δ), dos niveles de calentamiento nocturno: N5+ (■) y N10+ (▲). Cada punto representa el valor para una cámara de temperatura individualmente controlada129

Figura 4.6. Variación en la proporción de ácido palmítico (a), esteárico (b), oleico (c), linoleico (d), y linolénico (e) en función de la temperatura media durante el período de tratamiento. Los porcentajes fueron calculados sobre la base del aceite sintetizado durante el período de tratamiento. Los tratamientos fueron: control T0 (○), dos niveles de calentamiento diurno: D5+ (□) y D10+ (Δ), dos niveles de calentamiento nocturno: N5+ (■) y N10+ (▲). Cada punto representa el valor para una cámara de temperatura individualmente controlada131

Figura 4.7. Variación en la proporción de ácido palmítico (a), esteárico (b), oleico (c), linoleico (d) y linolénico (e) en función de la amplitud térmica durante el período de tratamiento. Los porcentajes fueron calculados sobre la base del aceite sintetizado durante el período de tratamiento. Los tratamientos fueron: control T0 (○), dos niveles de calentamiento diurno: D5+ (□) y D10+ (Δ), dos niveles de calentamiento nocturno: N5+ (■) y N10+ (▲). Cada punto representa el valor para una cámara de temperatura individualmente controlada133

Índice de Imágenes

Imagen 1. Vista de un bloque del experimento en el campo. Se observan las cámaras que encierran las ramas fructíferas, los parantes que sostienen a la cámara y la tela media sombra por arriba. El cableado corresponden a las conexiones de los sensores y de los sistemas de refrigeración, calefacción y ventilación de las cámaras.....52

Imagen 2. Vista externa de la cámara termostatizada. Se observa en los laterales de la cámara recubiertos con material aislante térmico, el cableado y la media sombra ubicado por encima de la tapa transparente.....53

Imagen 3. Cámara de enfriamiento. Esta imagen muestra el lateral externo de la cámara donde se observa el disipador de calor (que está unido a la cara caliente del peltier) sujeto a un lateral externo de la cámara por el cual circuló un flujo constante de agua para mejorar la capacidad de refrigeración del sistema. El agua que goteaba era colectada en un bidón que tenía una bomba y permitía la recirculación del agua.....54

Abreviaturas

°C: grados centígrados

DDEE: días después de endurecimiento del endocarpo

FAD: enzima desaturasa de ácidos grasos

IM: índice de madurez

MNT: Temperatura mínima nocturna

ODS: enzima oleato desaturasa

TM: temperatura media

Publicaciones derivadas de la tesis

García-Inza GP., Castro D., Hall A., Rousseaux MC. 2014. Responses to temperature of fruit dry weight, oil concentration, and fatty acid composition in olive (*Olea europaea* L. var. Arauco). *Europ. J. of Agronomy*. 54. 107-115.

Resumen

Efecto de la temperatura sobre el peso seco, contenido de aceite y la proporción de ácidos grasos en el aceite de frutos de olivo (*Olea europaea* L. var `Arauco`)

Las respuestas de los componentes del rendimiento y de la calidad del aceite a la temperatura aún no han sido estudiadas en olivo ni en otras oleaginosas que acumulan aceite principalmente en mesocarpo (cerca de 95% del total en el caso de olivo). La información disponible en olivo se basa en correlaciones ligadas a variaciones en ubicación geográfica, altitud y años en los que pudieron covariar con la temperatura otros factores (radiación, disponibilidad hídrica, nutrición, etc). El objetivo de esta tesis fue evaluar el rol de la temperatura durante el crecimiento de frutos de olivo sobre el peso seco de los mismos, su contenido y concentración de aceite y las proporciones de ácidos grasos del aceite. Se realizaron experimentos manipulativos aplicados a ramas fructíferas creciendo a campo, utilizando cámaras transparentes con control y registro de temperatura. Los rangos de temperaturas medias alcanzados (entre 15-32 °C) fueron mucho mayores a los rangos de 1 y 4 °C logrados en estudios correlativos y permitieron generar relaciones funcionales para el peso seco del fruto, su concentración de aceite, y la proporción de ácidos grasos en el aceite. El contraste entre aplicaciones de temperaturas mayores o menores al ambiente durante períodos largos (114 días) y cortos (30 días) demostraron que tanto la proporción de aceite del fruto como la de ácido oleico en el aceite de fruto entero (mesocarpo + semilla) disminuye al aumentar la temperatura. Si bien en ambas estructuras del fruto la temperatura tuvo un efecto negativo sobre la concentración de aceite, las respuestas a la temperatura de la proporción de ácidos grasos de la semilla y el mesocarpo, medidos en forma separada, difirieron entre sí. Los patrones de respuesta de las proporciones de ácidos grasos en el aceite de semilla mostraron similitudes con las conocidas para especies oleaginosas de semilla como girasol. Por contraste, en el aceite de mesocarpo de olivo la proporción de ácido oleico disminuyó con el aumento de la temperatura, patrón opuesto a lo manifestado en semillas de olivo y en las de oleaginosas anuales. En esta tesis también se evaluó el efecto de la temperatura mínima nocturna sobre el crecimiento de los frutos y la calidad del aceite. Los resultados sugieren que la temperatura mínima nocturna y la amplitud térmica diarias son las dimensiones del régimen térmico diario con los que mejor se asociaron los cambios en el peso seco del fruto, la proporción de aceite y las proporciones de ácidos grasos en el mismo. Los resultados de esta tesis sirven para guiar la selección de sitios de plantación de nuevos olivares basados en los registros térmicos zonales, y para explicar los desajustes de la proporción de ácidos grasos del aceite de oliva producido en el NOA y la normativa del Consejo Oleícola Internacional (COI). Las relaciones funcionales entre las variables respuesta y la temperatura definidas podrán incorporarse en modelos de simulación del rendimiento y calidad que

se desarrollen en el futuro. Tomados en conjunto con la tendencia al aumento de la temperatura, producto del calentamiento global, los resultados permitirán estimar la magnitud de los impactos negativos que podrían afectar el rendimiento del cultivo y la calidad del aceite.

Palabras claves: aceite de oliva, aceite de mesocarpo, aceite de semilla, % oleico en aceite, temperatura media, temperatura mínima, amplitud térmica, temperatura mínima nocturna

Abstract

Temperature effect on fruit dry weight, oil concentration and fatty acid proportion in olive fruits oil (*Olea europaea* L. var 'Arauco').

Yield component and oil quality responses to temperature have not been studied in olive or other species that accumulates oil mainly in the mesocarp (around 95% of the total oil accumulated in the olive). Available information for olive is based on correlations linked to geographical location, altitude or inter-year variations in which other factors (radiation, water availability, nutrition, etc) could be covarying with temperature. The aim of this thesis was to evaluate the role of temperature during olive fruit growth on fruit dry weight, oil concentration and oil fatty acid proportions. Manipulative experiments were applied under field condition to fruiting branches, using transparent chambers to control and record temperature. Average temperature ranges achieved (15 to 32 °C) were much higher than the ranges of 1-4 °C reported in correlative studies. This wide range allowed the generations of functional relationships between fruit dry weight, oil concentration and oil fatty acid proportions and temperature. The contrast between lower or higher than ambient temperatures applied for long (114 days) and short (30 days) periods showed that both oil content and oleic acid proportion in whole fruit (mesocarp + seed) decreases with increasing temperature. While both fruit structures showed a negative response of oil concentration to temperature, fatty acid proportion responses in seed and the mesocarp (measured separately) differed. Response patterns of the proportions of fatty acids in olive seed oil was similar to that known for oilseed species such as sunflower. By contrast, in olive mesocarp oil, the proportion of oleic acid increased with increasing temperature, a pattern opposite to that exhibited by oil from seeds of olive and annual species. The effect of night minimum temperature on fruit growth and oil quality was also evaluated. The results suggest that minimum night temperature and daily thermal amplitude are the dimensions of the daily thermal regime that exhibit the strongest associations with fruit dry weight, oil concentration and changes in fatty acid proportions. The results of this thesis provide information to guide site selection for new olive groves based on the thermal records. In addition, they explain the discrepancies in fatty acid proportions found between olive oil produced in NW Argentina and the standards of the International Olive Council (COI). The functional relationships between the response variables studied in these experiments and temperature could be incorporated into simulation models of olive yield and oil quality that could be developed in the future. Finally, the results permit estimations of the magnitude of negative impacts on crop yield and oil quality arising from the current trend of increasing temperature, a product of global warming.

Keywords: olive oil, mesocarp oil, seed oil, % oleic acid, average temperature, minimum temperature, thermal amplitude, minimum night temperature

Capítulo I

Introducción General

Capítulo I

Introducción General

1.1 Marco teórico

El olivo (*Olea europaea* L.) es una especie cultivada principalmente por el valor económico de sus frutos, botánicamente clasificados como drupas, que acumulan aceite durante su crecimiento. La mayor cantidad de aceite se sintetiza y acumula en el tejido del mesocarpo y una menor proporción en el embrión (Conde et al., 2008), al igual que ocurre en otros frutales oleaginosos como la palma aceitera o la palta. Estos cultivos perennes se caracterizan por tener periodos prolongados (entre 4-6 meses) de crecimiento del fruto y acumulación de aceite. Estas características agrupan a estas especies oleaginosas en un conjunto distinto al de las especies oleaginosas que acumulan aceite principalmente en semilla (girasol, maní, maíz, soja, colza, etc).

El crecimiento, la acumulación y la calidad del aceite de los frutos son modulados por el ambiente. En olivo se observa que la radiación interceptada (Villalobos et al., 2006) y el estado hídrico (Moriana et al., 2003) de las plantas afectan el rendimiento aceitero de los frutos. Inclusive, distintos métodos de riego modifican el perfil ácido del aceite (Dabbou et al., 2010). La temperatura es uno de los principales factores ambientales que regula el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Pérez-López et al., 2008); sin embargo se desconoce el efecto que tiene este factor sobre el crecimiento, contenido de aceite y composición ácida en oleaginosas que acumulan aceite principalmente en mesocarpo. Hasta el momento la información generada se basa en estudios que correlacionan la temperatura de distintos sitios o años con variables medidas en fruto como el peso, concentración de aceite, composición de ácidos grasos, etc. (Rondanini et al., 2011; Trentacoste et al., 2012). Esta información puede orientar sobre las posibles respuestas de las plantas a la temperatura aunque puede enmascarar respuestas a factores no controlados en los conjuntos de sitios y años. Además, los rangos de temperatura explorados en estos análisis fueron restringidos (23-27 °C y 18.8-19.7 °C respectivamente), detalle que impide la clara definición de funciones de respuesta a la temperatura.

El estudio de los efectos de la temperatura cobró relevancia en los últimos años dado el escenario imperante de calentamiento global. Según el panel intergubernamental para el cambio climático la temperatura se incrementó en promedio 0.85 °C en el período 1880-2012 (IPCC, 2013) con aumento en la frecuencia de eventos de temperaturas extremas (Hansen et al., 2012). Análisis de los registros térmicos de la provincia de La Rioja (importante centro olivarero en el país en el que las temperaturas estacionales tienden a ser mayores que las de la zona Mediterránea) mostraron que la temperatura media aumentó 0.4°C entre los años 1961 y 2011 (R. De Ruyver. Inta.Castelar, comunicación

personal). Además, Alexander et al. (2006) mostraron que las noches son más cálidas debido al aumento de la temperatura mínima media. En este contexto, fue relevante el estudio de las distintas dimensiones del régimen térmico hasta ahora no exploradas con el objetivo de entender que impacto tendría en la producción de olivo, de aceite de oliva y su calidad.

Tradicionalmente el olivo se cultivó en la región mediterránea, pero en los últimos años se expandió mundialmente incorporándose nuevos países fuera de esta región (Rugini et al., 2000; Mannina et al., 2001). Se detectaron que algunos aceites producidos en las nuevas zonas no cumplen con algunos parámetros establecidos por el consejo oleícola internacional (COI). Por ejemplo, en Australia (Mailer, 2005) y Francia (Ollivier et al., 2003), se encontraron valores de ácido linolénico superiores a la normativa, mientras que aceites del noroeste de Argentina (NOA) mostraron valores de ácido oleico por debajo de lo reglamentado, además de elevados valores de palmítico y linoleico (Ravetti et al., 1999). Otro estudio de correlación generado a partir de datos de distintos sitios, años y variedades, en valles cálidos del NOA Argentino, mostró que a mayor temperatura durante el período de crecimiento del fruto disminuye la proporción de ácido oleico en el aceite (Rondanini et al., 2008) (Fig. 1.1). Llamativamente esa respuesta es contraria a la conocida en oleaginosas anuales que acumulan aceite en la semilla (e.g. soja o girasol), en las que mayores temperaturas durante el llenado del fruto se correlacionan en aceites con mayor proporción de ácido oleico (e.g. Canvin 1965, Zuil et al., 2012).

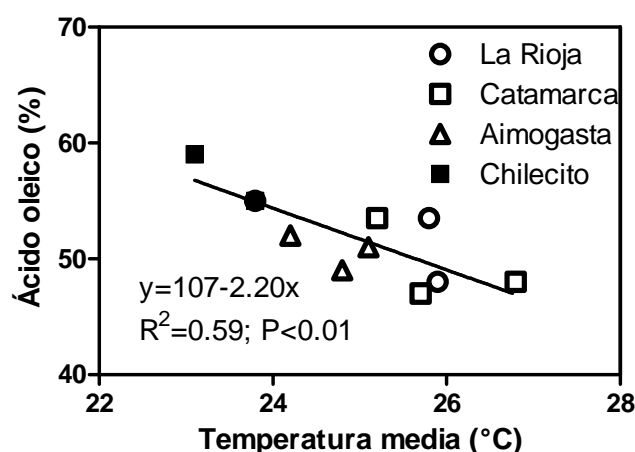


Fig. 1.1. Proporción de ácido oleico en el aceite de oliva del cultivar Arbequina en función de la temperatura media de frutos que crecieron distintas localidades del NOA. La temperatura es el promedio de los 5 meses que duró la acumulación de aceite (diciembre- abril). Cada punto es el promedio de la concentración de oleico en cada año por localidad, los años de muestreo abarcaron entre 2005-2008, aunque no toda las localidades tienen los 3 años de repetición. Figura adaptada de Rondanini et al. (2011).

En esta tesis se realizaron experimentos manipulativos de la temperatura (a las que se hallaron expuestos los frutos) en los que otros factores ambientales se mantuvieron constantes, permitiendo así describir las respuestas a la temperatura de variables productivas como peso seco del fruto, contenido de aceite y proporciones de ácidos grasos en el aceite.

En las subsecciones que continúan se exponen, con mayor detalle, los antecedentes existentes en materia de efectos de la temperatura sobre las variables de respuesta de mayor importancia consideradas en los experimentos que sirvieron de base para esta tesis.

1.1.1. El efecto de la temperatura sobre el peso seco del fruto

El peso seco del fruto de olivo está compuesto principalmente por el peso del mesocarpio y del endocarpio variando su proporción entre variedades. Comercialmente, el peso del mesocarpio es de mayor relevancia, ya sea en variedades de mesa por el calibre o en aceiteras por ser el tejido donde se acumula la mayor proporción de aceite. En olivo se conoce que el tamaño del mesocarpio se correlaciona positivamente con el número de células que se establecen luego de floración (Hammami et al., 2011). La división celular en este tejido ocurre a alta tasa en los primeros 2 meses, pero se extiende con menor tasa hasta la semana 24 después de floración. Finalmente, el tamaño del fruto a madurez fisiológica estaría determinado por factores endógenos (variedad, alternancia productiva) y por exógenos (temperatura, disponibilidad de agua, luz, etc.) que regulan los procesos de crecimiento y desarrollo.

Existen evidencias que muestran que la temperatura afecta el peso seco final de los frutos por dos vías, la tasa de crecimiento (incremento del peso por unidad de tiempo) y la duración del período (días desde cuaje a madurez fisiológica) de crecimiento del fruto. En especies anuales está bien documentada la relación entre la temperatura explorada durante el crecimiento del fruto con la tasa y duración del crecimiento del fruto (Trápani et al., 2003). En especies oleaginosas de semilla, como girasol, se conoce que la duración del período de crecimiento del embrión presenta una respuesta cóncava curvilínea y negativa a la temperatura, donde a 34 °C la duración del período es mínima. Por otro lado, la tasa de crecimiento sigue una función de tipo óptimo, con un pico a los 25 °C (Chimenti et al. 2001). Hasta el momento no existen trabajos que hayan estudiado el efecto de la temperatura sobre el peso seco del fruto (ni de la tasa y duración del crecimiento) en especies que acumulan aceite en el mesocarpio. Algunos trabajos se realizaron en otros frutales, por ejemplo en manzano. En esta especie Atkinson et al. (1998) colocaron túneles de polietileno sobre árboles enteros desde floración a cosecha de fruto. Este experimento concluyó que el aumento de 1 °C de la temperatura durante el crecimiento de los frutos generó mayor tamaño de células corticales y mayor tasa de crecimiento absoluta del fruto. Por otro lado en vid, Radler (1965) registró una disminución en el tamaño de la uva al

comparar frutos creciendo a temperatura ambiente *versus* frutos expuestos a 33°C constantes por tres meses. También en vid, no se observaron diferencias en el peso del fruto luego de 2 meses de variar la temperatura en racimos (Spayd et al., 2002) o bien, calentando plantas enteras 2 °C por encima de la temperatura ambiente (Sadras y Soar 2009). Estos resultados muestran que en frutos de especies perennes la respuesta frente a pequeños cambios en la temperatura son menos marcados que en especies anuales, posiblemente vinculadas al extenso periodo de crecimiento del fruto.

Hasta el momento la información existente sobre el efecto de la temperatura sobre el peso de los frutos en olivo se basó en estudios de correlación entre las temperaturas estacionales y los componentes del rendimiento. Trentacoste et al. (2012), no encontraron relación entre el peso fresco del fruto de 10 variedades y la temperatura media estacional (aunque el rango térmico explorado fue acotado; entre 18.9 °C y 19.7 °C). Otro trabajo realizado sobre 6 variedades de olivo por 2 temporadas y en 3 localidades distintas (abarcando un rango de temperatura media estacional entre 23°C y 27°C) mostró que las variaciones en el peso seco final del fruto se explican mejor por las variaciones en la tasa de crecimiento que en la duración, aunque no detectó relación entre la tasa de crecimiento del fruto y la temperatura (Rondanini et al. 2014). Esta información basada en datos meteorológicos es valiosa, sin embargo otros factores no controlados pueden estar interviniendo en la respuesta. La presente tesis evaluó el efecto de la temperatura sobre el peso seco del fruto mediante experimentos manipulativos y de prolongada (4 meses) y corta (1 mes) duración en frutos de olivo.

1.1.2. Efecto de la temperatura explorada durante el crecimiento del fruto sobre la concentración de aceite

La temperatura ambiente durante el crecimiento de los frutos en la planta puede provocar variaciones en la concentración de aceite de las semillas. Por ejemplo, en cacao, la concentración de aceite en la semilla tiene una respuesta a la temperatura explorada durante el crecimiento del fruto del tipo óptimo, alcanzando la máxima concentración de aceite entre los 23-24 °C (Daymond y Hadley 2008). Estudios más complejos probaron el efecto de altas temperaturas en distintos momentos del crecimiento del fruto. En girasol, el contenido de aceite de la semilla se afectó por altas temperaturas (>35°C) entre los días 12-19 ó 19-26 después de floración, tratamientos que produjeron disminuciones significativas en el contenido de aceite (Rondanini et al. 2003). Estos antecedentes ponen en evidencia que dicho factor, ya sea por el efecto de la temperatura media sostenida durante el período de crecimiento, o en intervalos de pocos días de altas temperaturas (>35°C), tiene efecto sobre el contenido final de aceite de las semillas.

La respuesta de la concentración de aceite al aumento de temperatura ambiente durante el crecimiento estaría modulada por efectos directos e indirectos. Los efectos

directos estarían ligados a cambios a nivel de expresión génica o en la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de aceite, que ocurren dentro del fruto como consecuencia del aumento de temperatura. Los efectos indirectos estarían vinculados a cambios metabólicos ó fisiológicos en el fruto y en otros órganos como las hojas. Por ejemplo, el aumento de la temperatura ambiente provoca modificaciones en la tasa respiratoria, en la tasa de asimilación de CO₂, en la eficiencia en el uso de la radiación, etc. Evidencias en trigo muestran que aumentos de temperatura durante el crecimiento del fruto incrementan la tasa respiratoria, destinándose más fotoasimilados a respiración en detrimento de la acumulación de materia seca (Chowdhury y Wardlaw, 1978). En capítulos de girasol y sus frutos se analizaron separadamente las dos funciones de la respiración, es decir, la de mantenimiento y de crecimiento (Ploschuk y Hall, 1997). Estos autores observaron que ambas respiraciones aumentaron con la temperatura. La respiración de crecimiento no varió su rendimiento de conversión, que hace referencia a los g de glucosa necesarios para generar nueva biomasa (g de biomasa sintetizada / g de glucosa respirado), mientras que la respiración de mantenimiento disminuyó su eficiencia. Si bien en olivo no se conoce la respuesta de la respiración a la temperatura, se puede esperar una respuesta similar a lo informado para girasol. Esto podría impactar negativamente en el contenido de aceite puesto que es un compuesto de alto costo energético de síntesis (para lograr 1 g de lípidos se requiere invertir 2.71 g de glucosa (Loomis y Connor, 2002)). Este vacío en el conocimiento de la respuesta a la respiración en frutos de olivo muestra que aún quedan vacantes experimentos a nivel fisiológico básicos que permitan conocer en detalle la respuesta de los frutos a factores ambientales. En cuanto a los efectos directos existen trabajos realizados en laboratorio analizando las respuestas en enzimas relacionadas a la síntesis de lípidos de reserva como las denominadas diacilglicerol aciltransferasas (DGATs) encargadas de catalizar el último paso en la síntesis de triglicéridos. Por lo pronto se conoce que la expresión de esta enzima está regulada por el desarrollo del fruto (Banilas et al. 2011). Salas et al. (2000) observaron que su actividad se incrementa al pasar de 20°C a 30°C la temperatura de incubación de microsomas extraídos de frutos, pero decrece a temperaturas mayores. La presente tesis indaga el efecto que tiene la temperatura durante el crecimiento del fruto sobre la concentración de aceite en frutos de olivo. El estudio aporta datos que permiten esclarecer el efecto de la temperatura experimentada por los frutos en períodos prolongados de exposición a variaciones térmicas, tanto sobre la concentración de aceite del fruto entero cómo sobre cada una de las estructuras del mismo que acumulan aceite (mesocarpo y semilla).

1.1.3. La temperatura como modulador de la composición de ácidos grasos presentes en el aceite de frutos de olivo

La composición acídica del aceite de oliva varía entre variedades, pero se ha observado que factores ambientales también pueden modificarla (Beltrán et al. 2008;

Rondanini et al. 2011). En esta tesis se propuso al factor temperatura como posible modulador de la composición de los ácidos grasos. Hasta ahora sólo existen evidencias indirectas de respuestas de la composición acídica a la temperatura. En dichos estudios otros factores ambientales y fisiológicos como radiación, precipitaciones, disponibilidad de nutrientes, nivel de carga, relación/ fuente destino, etc, podrían estar variando conjuntamente con la temperatura (ver más adelante).

Ceci y Carelli (2010) recopilaron datos sobre la composición acídica de las variedades más cultivadas en zonas productoras argentinas, y observaron que iguales genotipos creciendo bajo distintas condiciones agroclimáticas presentan variabilidad en la composición acídica del aceite. Por ejemplo, el análisis de aceites provenientes de La Rioja, Mendoza, Bahía Blanca y Las Grutas muestra que a menor latitud (i.e., mayores temperaturas medias), menor porcentaje de ácido oleico y mayor de palmítico y linoleico. Por otra parte, un estudio realizado en Italia, mostró que existe una correlación negativa entre la concentración de ácido oleico y la sumatoria de temperatura máximas o mínimas durante los meses de maduración de los frutos (Orlandi et al., 2012). Una respuesta similar encontraron Rondanini et al. (2011) analizando muestras de la var. Arbequina provenientes de sitios de diferentes latitudes, altitudes y años de cultivo. Así, encontraron que el porcentaje de oleico disminuyó dos puntos porcentuales por cada grado centígrado que se incrementa la temperatura media del sitio durante la subfase de síntesis activa de aceite.

Algunas variedades pueden manifestar distintos patrones de evolución del porcentaje de ácido oleico al avanzar el período de crecimiento del fruto. Las variedades Arbequina y Arauco exhibieron una continua disminución de la proporción de oleico del aceite durante el crecimiento de los frutos en zonas cálidas de Argentina (Rondanini et al. 2014). Sin embargo este patrón no se observó en Cataluña donde el porcentaje de oleico en la variedad Arbequina no varió durante la maduración del fruto (Tous y Romero 1994). Por último, en un experimento preliminar de esta tesis, calentando ramas fructíferas de olivo de la var. Arauco se encontró que cuando la temperatura media de los frutos fue 7° C mayor al de plantas control durante el primer mes luego de endurecimiento del endocarpo, los frutos tuvieron 4 puntos porcentuales menos de ácido oleico que el control (García-Inza, 2010). Este conjunto de evidencias sustentan la hipótesis que la temperatura durante el crecimiento de los frutos afecta la composición de ácidos grasos del aceite en el olivo. Resulta esencial enfatizar el hecho que este patrón de disminución del ácido oleico con mayores temperaturas contrasta con lo conocido para oleaginosas que acumulan aceite en semilla. La existencia de esta controversia dio lugar a uno de los objetivos de esta tesis que permitió poner a prueba el efecto de la temperatura sobre la proporción de ácidos grasos del aceite, en experimentos que mantienen sin variación los otros factores que podrían estar modificando la respuesta.

1.1.4. Variación diferencial en la composición ácida del aceite sintetizado en semilla y mesocarpo según las temperaturas exploradas durante el crecimiento del fruto

El crecimiento del fruto de olivo se extiende entre 5-6 meses (desde el cuaje a madurez fisiológica) e incluye 5 subfases (Fig.1.2.) (Conde et al., 2008). Luego del cuaje, comienza la división celular y el crecimiento de la semilla (subfase I y II respectivamente); posteriormente el endocarpo se esclerifica (subfase III), las células del mesocarpo se expanden y hay activa acumulación de aceite en dicho tejido (subfase IV). El mayor porcentaje de aceite se acumula en la subfase IV con escasa contribución durante la subfase V de maduración que se caracteriza por el cambio de pigmentación de los frutos. En un fruto ya maduro, la contribución del aceite proveniente del mesocarpo es del orden de 95% mientras que la semilla es del orden de 5%, aunque estas proporciones son variable según la variedad (Conde et al., 2008). El patrón de crecimiento descrito del fruto de olivo pone de manifiesto la diferencia temporal en la que se da la síntesis de aceite en las dos estructuras oleíferas del fruto.

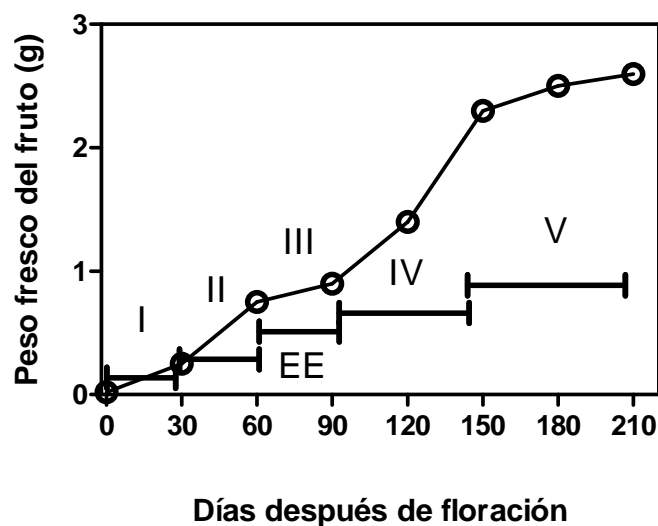


Fig.1.2. Dinámica del incremento del peso fresco del fruto del olivo desde floración (día cero) a madurez del fruto. Los intervalos indican las subfases del crecimiento del fruto. Durante la subfase I ocurre la fertilización de las flores y cuaje de los frutos, durante la subfase II tiene lugar principalmente el crecimiento de la semilla; la subfase III corresponde a la esclerificación del endocarpo (EE), seguido de crecimiento del mesocarpo (IV) y la maduración (V). Figura adaptada de Conde et al. (2008).

La mayor parte de la información disponible acerca de la respuesta a la temperatura de la composición acídica del aceite corresponde a especies anuales que acumulan aceite en la semilla. En girasol, se conoce que la enzima oleato desaturasa (ODS), enzima clave en la insaturación del ácido oleico resultando en ácido linoleico, es termolábil y disminuye su actividad enzimática con temperaturas $>25^{\circ}\text{C}$ (Garcés y Mancha 1993). Para olivo se han descrito dos genes distintos que codifican para la enzima oleato desaturasa. Estas enzimas (FAD 2 y FAD 6) estarían presentes en la semilla y en el mesocarpo pero su expresión sería regulada diferencialmente durante el desarrollo (Banilas et al., 2005). La información proveniente de estudios bioquímicos en mesocarpo muestran que tanto la expresión (Hernández et al., 2011) como la transcripción (Matteucci et al., 2011) de las enzimas involucradas en la insaturación de los ácidos grasos del aceite están reguladas por la temperatura. Las evidencias obtenidas hasta el momento, sugieren que en mesocarpo de olivo dichas enzimas responden a la temperatura de igual manera que en girasol (i.e., el porcentaje de ácido oleico aumenta con mayor temperatura). Sin embargo, análisis de aceites obtenidos de frutos enteros mostraron cambios en el perfil acídico contrastantes en respuesta a incrementos en la temperatura. Por ejemplo en la variedad Arbequina la concentración de oleico disminuyó 2% por cada $^{\circ}\text{C}$ de aumento de la temperatura media (Rondanini et al., 2011). Este resultado muestra una respuesta no usual a la temperatura del

aceite acumulado en el mesocarpo de frutos respecto al aceite de semilla de especies oleaginosas anuales. Estos antecedentes muestran el desajuste que existe entre lo conocido hasta el momento a nivel molecular en olivo, lo observado en oleaginosas anuales y lo observado a campo en estudios de correlación. Estos hechos ponen a la luz la necesidad de una investigación *ad-hoc* para confirmar lo observado a campo y servir de punto de partida para estudios bioquímicos dentro de un marco general sólidamente establecido.

Si bien son conocidas las respuestas en forma empírica, todavía no están bien definidos los mecanismos de control que ocurren en el fruto y que modulan el perfil ácido. Dado los antecedentes encontrados en la bibliografía sobre oleaginosas anuales, se podría pensar que existe una respuesta integral a la temperatura que tendría diferente impacto según el momento de la síntesis de aceite en el que se estudie y de la duración del evento de alta temperatura. En oleaginosas que acumulan aceite en semilla como girasol, la temperatura mínima nocturna explorada en períodos tempranos del llenado (100-300 °Cd, temperatura base 6 °C) del fruto explican el 80% la concentración de ácido oleico final del fruto (Izquierdo et al. 2006). Esto pone de manifiesto que la temperatura durante el primer tercio del período de llenado de frutos produce cambios con efectos permanentes en la composición del aceite. Llamativamente, en ensayos manipulativos del efecto de la temperatura sobre capítulos de girasol, aumentos de la temperatura por 6-7 días en fases tempranas permitieron un restablecimiento de los niveles de ácido oleico a cosecha final. Por el contrario, el aumento de la temperatura en el tercio final del llenado produce cambios irreversibles, obteniéndose mayor concentración de oleico (Rondanini et al. 2003). Estas repuestas aparentemente opuestas entre lo que ocurre al analizar la temperatura mínima nocturna (TMN) y la temperatura media en un período corto estaría evidenciando dos mecanismos de control simultáneos: uno temprano de efecto permanente y otro que actuaría durante todo el período de llenado y que sería reversible. Esta cuestión, aún sin resolver en oleaginosas anuales, abre también un interrogante sobre los mecanismos que operan en la composición ácida del aceite de oliva. El vacío de conocimiento en esta temática motiva el desarrollo de un estudio que contemple el efecto de la temperatura nocturna (siguiente sección) y el de la temperatura en períodos muy tempranos de la síntesis de aceite en olivo (momento en que el contenido de aceite es bajo).

Hasta el momento, los estudios en olivo centran la atención en la composición del aceite extraído del fruto entero o del mesocarpo. Sin embargo, los frutos de olivo acumulan aceite tanto en semilla como en mesocarpo y lo hacen en distintas subfases del crecimiento del fruto. La semilla acumula aceite durante la subfase I y II mientras que en mesocarpo la mayor proporción de aceite se acumula en la subfase IV (Fig. 1.2). Estas diferencias entre tejidos y en ventanas temporales de síntesis podrían estar contribuyendo a las diferencias observadas respecto a las especies anuales. En especies oleaginosas que acumulan aceite en mesocarpo y semilla, todavía no se han realizado ensayos manipulativos de la temperatura durante el crecimiento del fruto que muestren la respuesta de la composición ácida de fruto entero ni en los distintos tejidos. Estos antecedentes dan lugar a otro de los objetivos de este trabajo que fue cuantificar el efecto del aumento de la temperatura en períodos muy

tempranos del desarrollo del fruto (antes del endurecimiento del endocarpo, cuando hay activo crecimiento de la semilla) sobre la composición ácida, determinando separadamente el perfil del aceite de la semilla, representado en mayor medida por el aceite embrional, y comparándolo con el sintetizado en el mesocarpo.

1.1.5. Ciclo diario luz/oscuridad: efecto del momento en que ocurren las altas temperaturas sobre la composición de ácidos grasos del aceite del fruto

En las plantas muchos procesos como la expresión de genes, apertura estomática, la respuesta fotoperiódica, etc, son controlados por un ritmo circadiano. Se trata de una estimación interna del tiempo que sincroniza eventos biológicos con el ciclo externo día/noche. Esta sincronización ayudaría a incrementar la supervivencia de las plantas y aumentaría sus ventajas competitivas (Dodd et al., 2005). Se ha propuesto que las enzimas involucradas en la insaturación de los ácidos grasos también responden al ciclo luz/oscuridad. Por ejemplo, un estudio que analizó el nivel de expresión de genes en frutos de olivo, mostró que los genes FAD2 y FAD6 (que codifican para enzimas involucradas en el pasaje de 18:1 a 18:2) disminuyeron considerablemente su expresión en las primeras 3 horas de la fase oscura, manteniéndose a niveles muy bajos el resto del tiempo de tratamiento (Hernández et al., 2011). Contrariamente a lo observado en olivo, se encontró que la enzima análoga en girasol tiene actividad durante la fase oscura (Pleite et al., 2008). En este último trabajo, también se midió la actividad de la estearato-ACP desaturasa (SAD, encargada de catalizar el pasaje de 18:0 a 18:1) durante el ciclo día/ noche, mostrando que la mayor actividad se dio en las últimas horas de oscuridad y las primeras del día. Sin embargo, cuando las condiciones fueron de luz y temperatura constante, no se mantuvo el ritmo circadiano y la actividad enzimática aumentó durante las primeras 24 h. A pesar de sus imperfecciones, estas evidencias muestran que hay señales (directas o indirectas) relacionadas al ciclo luz/ oscuridad que podrían ocasionar cambios en el perfil ácido del aceite.

Algunos trabajos en los que se manipuló la temperatura de crecimiento de plantas con el fin de evaluar la composición ácida de los frutos se han focalizado en la temperatura media diurna y la nocturna. Esto se debe a que conjuntamente con el ciclo diario de luz/ oscuridad se registra alternancia de las temperaturas durante el día y la noche. La temperatura del día es mayor que la nocturna, la diferencia entre ellas se denomina amplitud térmica y es variable para distintos ambientes. Experimentos en girasol donde se elevó (10°C) la temperatura media nocturna durante la estación de crecimiento del fruto, mostraron incrementos en la concentración de ácido oleico (14.6 puntos porcentuales) respecto a frutos creciendo a temperatura ambiente (Izquierdo et al., 2002). En este mismo cultivo, datos generados a partir de plantas creciendo en cámaras y datos de

dos sitios distintos exhibieron una correlación entre la concentración de ácido oleico con la temperatura mínima nocturna, encontrando que dicha concentración aumenta con un patrón sigmoideal al incrementar la temperatura mínima nocturna (TMN) experimentada entre los 100 y 300°C d después de floración (Izquierdo y Aguirrezábal 2008). Esto indica que para un rango de temperaturas la respuesta de la concentración de dicho ácido graso a la TMN es positiva y lineal en girasol. En soja también se detectaron variaciones en el perfil ácido del aceite al modificar las temperaturas nocturnas durante el crecimiento de las semillas. Cuando la temperatura de la noche aumentó de 20°C a 30°C, en plantas creciendo a 30°C durante las horas de luz, el ácido oleico disminuyó de 239 a 210 mg de oleico. g de aceite⁻¹. Sin embargo, cuando la temperatura del día fue más cálida (35°C), el aumento de la temperatura nocturna (de 20°C a 30°C) elevó el contenido de este ácido graso de 281 a 343 mg de oleico. g de aceite⁻¹ (Gibson y Mullen 1996), esto último en sintonía con los aumentos hallados en girasol. Este conjunto de antecedentes permiten deducir que hay procesos metabólicos asociados a la temperatura nocturna que afectan la insaturación de los ácidos grasos y varían la composición del aceite.

Hoy en día se desconoce el efecto que tienen las temperaturas nocturnas sobre la composición de los ácidos grasos en frutos que acumulan aceite en mesocarpo. Este vacío de conocimiento dio lugar a uno de los objetivos de la presente tesis que fue evaluar la respuesta de la composición ácida en frutos de olivo a la temperatura nocturna durante el período de activo crecimiento del fruto.

1.1.6. Resumen

Los experimentos efectuados como parte de esta tesis tienen como objetivo echar luz sobre el papel de la temperatura en la determinación de los principales parámetros productivos del olivo como son el peso seco del fruto, concentración de aceite y composición de ácidos grasos. Se complementa así los trabajos que evaluaron este factor en forma indirecta (Ceci y Carelli 2010; Rondanini et al., 2011, Trentacoste et al., 2012) tomando datos de diferentes años o sitios de cultivo, o en forma directa, (Hernández et al., 2011; Matteucci et al., 2011) trabajando sobre frutos separados de la planta y llevados a condiciones de laboratorio por períodos cortos. Los experimentos efectuados para esta tesis involucraron la manipulación de la temperatura de los frutos en crecimiento por períodos prolongados (>30 días). Los resultados obtenidos, informados en esta tesis, permitieron conocer la respuesta de fruto entero y de las dos estructuras que acumulan aceite en el fruto (semilla y mesocarpo), y evaluar las respuestas del fruto a las distintas dimensiones del régimen térmico (temperatura mínima, temperatura máxima, amplitud térmica). Además, propone generar un marco de referencia para re-direccionar estudios a escala más detallada (nivel bioquímico/molecular) cuyos antecedentes no permiten explicar lo observado a campo.

1.2. Objetivos e Hipótesis

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el papel de la temperatura experimentada durante el crecimiento de frutos de olivo sobre el peso seco del fruto, su concentración de aceite y la proporción de ácidos grasos en el aceite proveniente del mismo.

1.1.2. Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Determinar la relación funcional entre temperatura media durante la subfase IV del crecimiento del fruto y el peso seco, concentración de aceite y proporción de ácidos grasos del aceite del fruto de olivo.

Hipótesis 1.1: El incremento en la temperatura media diaria durante el crecimiento del fruto afecta negativamente el peso seco del fruto.

Hipótesis 1.2: Aumentos en la temperatura media del aire durante el crecimiento del fruto provocan disminución en el porcentaje de aceite a madurez fisiológica.

Hipótesis 1.3: Aumentos en la temperatura media del aire durante el crecimiento del fruto resultan en variaciones en la proporción de los principales ácidos grasos que componen el aceite de oliva.

Objetivo específico 2: Comparar el efecto del aumento de la temperatura en un período muy temprano del desarrollo del fruto (antes del endurecimiento del endocarpo) y un período más tardío sobre la composición ácida del aceite sintetizado en semilla y el sintetizado en mesocarpo.

Hipótesis 2.1: Aumentos en la temperatura media, durante períodos tempranos del desarrollo del fruto, provocan incremento en el porcentaje de ácido oleico del aceite sintetizado en semilla, mientras que en el aceite de mesocarpo la proporción del mismo disminuye.

Objetivo Específico 3: Cuantificar el impacto del aumento de la temperatura nocturna durante el período de activo crecimiento del fruto sobre la proporción de los ácidos grasos del aceite.

Hipótesis 3.1: La composición ácida del aceite se verá afectada por el incremento de la temperatura mínima nocturna explorada durante el crecimiento del fruto; a mayor temperatura, menor porcentaje de ácido oleico y mayor de linoleico y palmítico.

1.3. Estructura de la tesis

Esta tesis se centró en el estudio de los efectos de la temperatura sobre los parámetros de rendimiento y calidad del aceite en olivo. En lo que resta de la tesis se presentarán los resultados de los experimentos efectuados para lograr los objetivos específicos planteados en la Secc. 1.7. Los resultados de los experimentos serán presentados en capítulos separados. El primer capítulo de resultados (Cap. II) se centra en evaluar la relación funcional entre temperatura media durante la subfase IV del crecimiento y parámetros de rendimiento y calidad del aceite del fruto entero de olivo. El siguiente capítulo (Cap. III), compara el efecto del aumento de la temperatura sobre la proporción ácidos grasos de los aceites sintetizados en la semilla y en el mesocarpio en forma separada. El último capítulo de resultados (Cap. IV) se basa en la cuantificación del impacto del aumento de la temperatura nocturna, durante el período de activo crecimiento del fruto, sobre la proporción de ácidos grasos del aceite del fruto entero. Los experimentos descritos en los Caps. 2, 3 y 4 involucraron el uso de cámaras termostatzadas que encerraron 2 ramas fructíferas portadoras de 5-8 frutos cada una. El último capítulo (Cap. V), corresponde a la discusión general que busca resaltar los avances logrados en el conocimiento del tema, evaluar la aceptación o no de las hipótesis planteadas y discutir las prospectivas derivadas de los resultados de esta tesis.

Capítulo II

Efecto de la temperatura sobre el peso seco del fruto, la concentración de aceite, y la proporción de ácidos grasos en el aceite de oliva (*Olea europaea* L. var. 'Arauco')

Capítulo II

Efecto de la temperatura sobre el peso seco del fruto, la concentración de aceite, y la proporción de ácidos grasos en el aceite de oliva (*Olea europaea* L. var. 'Arauco')

2.1. Introducción

El olivo (*Olea europaea* L.) es una especie ampliamente cultivada en regiones con clima mediterráneo. El aceite extraído del fruto es beneficioso para la salud debido a su contenido de polifenoles y al alto porcentaje de ácido oleico. El método de extracción del aceite es mecánico, la mayor proporción proviene del mesocarpo (~ 95% del total), con una pequeña contribución de la semilla (~ 5%). El crecimiento del fruto se extiende entre 5-7 meses e incluye 5 subfases (Conde et al., 2008), tal como se detallo en la sección 1.3 de Cap. I. La mayor parte de la acumulación del aceite se produce durante la subfase IV, con un pequeño aporte durante la subfase de maduración (subfase V). La expansión del cultivo del olivo hacia zonas extra-mediterráneas amplió la diversidad de condiciones ambientales donde el crecimiento del fruto y la calidad del aceite pueden ser evaluados. La información generada bajo estas nuevas condiciones ambientales puede ser de utilidad para conocer las respuestas de los cultivos bajo futuros escenarios de cambio climático. Por ejemplo, en el noroeste de Argentina las temperaturas son más altas que en la Cuenca del Mediterráneo, especialmente en invierno y primavera, adelantando la fecha de floración (Gómez del Campo et al., 2010). Esto provoca un corrimiento de las etapas fenológicas, el endurecimiento de carozo se produce al final de la primavera y la acumulación de aceite se produce en los meses más calurosos del verano (Cherbiy-Hoffmann et al., 2013). En estas condiciones, los rendimientos de aceite en algunas variedades son menores que los informados para la cuenca del mediterráneo (Cherbiy-Hoffmann et al., 2012). Además, para algunas variedades la concentración de ácido oleico del aceite está por debajo de los límites (55-83%) propuestos por el Consejo Oleícola International (COI, 2013) para el aceite de oliva virgen extra, mientras que los ácidos palmítico, linoleico y linolénico superan los límites propuestos (20, 21, y 1%, respectivamente).

La temperatura regula el crecimiento y desarrollo en plantas. Los efectos de la temperatura sobre el crecimiento de la semilla (Sofield et al., 1977; Wardlaw et al., 2002) están bien documentado para cultivos anuales, por ejemplo, el girasol (Chimenti et al., 2001.). También en girasol, la concentración de aceite disminuye en respuesta a altas temperaturas durante el período de síntesis de aceite (Harris et al., 1978). Se ha visto incluso que un período de 7 días de estrés por calor son suficientes para reducir la duración

de la subfase de síntesis de aceite en la semilla (Rondanini et al., 2006). En olivo, un estudio correlativo mostró que la duración de la subfase de crecimiento del fruto se redujo con el aumento de la temperatura, mientras que no se detectó ningún efecto sobre la tasa de crecimiento del fruto (Trentacoste et al., 2012). Además, se encontró una relación negativa entre la duración del período de síntesis de aceite y el aumento de la temperatura. En este estudio correlativo, se utilizaron los datos de diferentes variedades y años, cubriendo un estrecho rango de variación de temperaturas medias (18.8-19.7 °C). La manipulación de temperaturas en un rango más amplio ayudará a clarificar la influencia de este factor sobre la concentración de aceite.

La proporción en la que se encuentra cada ácido graso en el aceite de oliva es un importante atributo de calidad y se utiliza para verificar la genuinidad del aceite (COI, 2013). La variedad es uno de los determinantes de la composición de ácidos grasos, pero algunos factores ambientales también podrían modificarlas. Algunos trabajos informaron cambios en la calidad del aceite al evaluar distintos años (Beltrán et al., 2004; Lombardo et al., 2008) o zonas de cultivo (Tous y Romero, 1994), que han sido atribuidas a diferencias climáticas. La concentración de ácido oleico, el principal ácido graso del aceite de oliva, disminuye a medida que disminuye la latitud o aumenta la altitud (por ejemplo, España, Tous et al., 1997; Australia, Mailer et al., 2010; Argentina, Ceci y Carelli, 2010; Italia, Orlandi et al., 2012). Este comportamiento contrasta con lo reportado para los cultivos oleaginosos de semilla, en los que latitudes más bajas han sido asociadas con aceites con mayor proporción de oleico, respuesta atribuida al aumento de la temperatura (por ejemplo, el girasol, Seiler y Brothers, 1999; Pereyra-Irujo y Aguirrezábal, 2007; soja, Maestri et al., 1998). Al manipular la temperatura en girasol, se encontró que altas temperaturas aumentan la proporción de ácido oleico en el aceite (Izquierdo et al., 2006). En olivo, un estudio de correlación que incluye datos de localidades y años diferentes (Rondanini et al., 2011) mostró una relación negativa entre la concentración de ácido oleico en el aceite de la var. 'Arbequina' y la temperatura media estacional. Por el contrario, a nivel de expresión de genes se ha demostrado que aquellos que codifican para la enzima oleato desaturasa (FAD) disminuyó luego de exponer ramas fructíferas de olivo por 24 h a altas temperaturas (35 °C) (Hernández et al., 2011). Aunque se esperaba que esta disminución a nivel de expresión de genes se asociara con un aumento en la concentración de ácido oleico y la correspondiente disminución en ácido linoleico, no se observaron cambios en ese sentido. Más estudios, tanto de laboratorio (a corto plazo, de la expresión bioquímica y genética) como de campo (a largo plazo, de fruto entero) y combinaciones de estos dos enfoques serán necesarios para entender la respuesta del ácido oleico a la temperatura.

La composición de ácidos grasos también puede variar dependiendo del momento de la ocurrencia del evento de alta temperatura. Por ejemplo, en el girasol (Rondanini et al., 2003), cuando se aplicaron temperaturas más elevadas durante la parte final de la subfase de acumulación de aceite, la proporción de ácido oleico aumentó mientras que la del ácido

linoleico se redujo. Además, cuando los tratamientos térmicos se aplicaron al inicio de la subfase de acumulación de aceite no se observaron cambios en la composición de los ácidos grasos debido a la capacidad de recuperación del fruto luego del período de estrés térmico. Es importante señalar que en girasol, como en otros cultivos anuales, el aceite se acumula en la semilla durante un corto período de tiempo (entre 30 y 45 días), y a elevada tasa. Por otro lado, en el fruto de oliva, palta o palma aceitera, el aceite se acumula principalmente en el mesocarpo durante un largo período (100 a 140 días) a baja tasa. Por lo tanto, es posible que después de eventos de alta temperatura, que generan cambios en la proporción de ácidos grasos, la proporción de ácidos grasos en el aceite de oliva se restablezca a valores normales. En la actualidad, no existe para olivo información sobre los efectos de la exposición a altas temperaturas por cortos períodos (por ejemplo, 30 días) durante la subfase de acumulación de aceite.

La información disponible actualmente de los efectos de la temperatura sobre la concentración de aceite de oliva y la proporción de ácidos grasos se basa en estudios correlativos con datos de diferentes años y / o lugares. No hay información disponible sobre los efectos de la exposición directa a alta temperatura durante semanas o meses en condiciones de campo. Los objetivos de estos experimentos manipulativos de la temperatura fueron: 1) determinar el efecto de la temperatura media durante la subfase de acumulación de aceite en el fruto de olivo sobre el peso seco, la concentración de aceite y composición de ácidos grasos; y 2) identificar, dentro de la subfase IV, la ventana de un mes que muestre la mayor sensibilidad al aumento de la temperatura sobre el peso seco del fruto, la concentración de aceite y la proporción de ácidos grasos y evaluar si presenta capacidad de recuperación después de la exposición a temperaturas más elevadas.

2.2. Métodos

2.2.1. Sitio experimental y tratamientos de temperatura

Se realizaron dos experimentos en 2009 y 2010 en Los Molinos (28° 43' S, 66 ° 56' W, 1400 m sobre el nivel del mar), provincia de La Rioja, Argentina. Esta ubicación fue seleccionada debido a su altitud, siendo un sitio fresco que permitió generar un amplio rango de temperaturas. El olivar fue plantado en 1940 a 6 m entre árboles y 12 m entre líneas. Las plantas fueron regadas por inundación cada 20 días durante todo el año, y se fertilizaron con 40 kg de estiércol de cabra por planta en la subfase de endurecimiento del carozo. La variedad Arauco (Barranco et al., 2000) se seleccionó debido a que un estudio anterior (Rondanini et al., 2014) mostró que el aceite de esta variedad (al igual que el de la var. Arbequina) difiere en la proporción de ácido oleico al analizar los aceites provenientes de regiones con distintas temperaturas medias. Esto sugirió que Arauco sería un modelo experimental adecuado para probar la sensibilidad de la concentración del ácido oleico a la

temperatura. Se realizaron dos experimentos de manipulación de la temperatura a nivel de rama durante la subfase IV del crecimiento del fruto, momento de mayor tasa de acumulación de aceite en mesocarpo (Cuadro 2. 1). En ambos años experimentales las fechas de endurecimiento del carozo se determinaron al momento de percibir la incapacidad de atravesar el carozo con el filo de un cuchillo. Para ello se realizaron pruebas cada dos días a partir de los 45 días después de la floración.

En el año 2010 se realizó un *experimento de cuatro meses de duración* para evaluar las funciones de respuesta a la temperatura del peso seco del fruto, la concentración de aceite y composición de ácidos grasos. Se seleccionaron ramas fructíferas y se colocaron en cámaras de temperatura controlada entre el 19 de enero y el 13 de mayo 2010 (es decir, 30 a 144 días después de endurecimiento del endocarpo DDEE). Se aplicaron cuatro regímenes térmicos: T0 (control), T4- (4° C por debajo de T0), T5+ y T10+ (5 y 10 °C más que T0, respectivamente).

El experimento denominado *un mes de duración* se realizó en 2009 y consistió de cuatro períodos consecutivos de aproximadamente 30 días de duración. Los tratamientos se aplicaron durante la subfase IV del crecimiento del fruto, que duró desde el 13 de enero hasta el 19 de mayo de 2009 (es decir, 24-147 DDEE). Se aplicaron dos regímenes térmicos: T0 (control) y T7 + (entre 6.2 y 7.3 ° C más alta que los valores de control según el momento) en cada uno de los cuatro períodos. El primer período se extendió del 13 de enero al 16 de febrero (E-F); el segundo, del 16 de febrero al 16 de marzo (F-M), el tercero desde 16 de marzo al 21 de abril (M-A), y el último desde el 21 abril al 19 de mayo de 2009 (A-M). Al comienzo de cada tratamiento dos ramas con frutos fueron encerradas en cada cámara con temperatura controlada; una rama se cosechó al finalizar el mes de tratamiento (cosecha intermedia) y la otra al finalizar el experimento (cosecha final).

En ambos experimentos, el diseño experimental fue en bloques completos al azar con cuatro repeticiones, donde cada árbol se tomó como bloque. Se utilizó un conjunto distinto de árboles cada año. Todos los tratamientos (4 niveles en el experimento de 4 meses de duración y los 2 niveles en el experimento de un mes) estuvieron representados en cada bloque. En el experimento de *un mes de duración* las cámaras se trasladaron a diferentes ramas del mismo árbol cuando el período de tratamiento anterior terminó. En ambos experimentos, se seleccionaron ramas fructíferas externas de alrededor de 20 cm de longitud que tuvieran entre 5 y 8 frutos por rama, con orientación Sur ($\pm 25^\circ$) y a una altura de 2-3 m (Imagen 1). Las ramas fueron encerrados en cámaras de acrílico de 22 × 22 × 10 cm (largo, ancho y alto, respectivamente) durante el período de tratamiento (Imagen 2). La relación hoja / fruto en las ramas seleccionadas se ajustó mediante raleo para asegurar relación fuente / destino uniforme a través de todas las ramas usadas en un experimento. La temperatura del aire en el interior de cada cámara se registró cada 15 min con sensores de temperatura conectados a un datalogger (datalogger, Cavadevices, Argentina).



Imagen 1. Vista de un bloque del experimento en el campo. Se observan las cámaras que encierran las ramas fructíferas, los parantes que sostienen a la cámara y la tela media sombra por arriba. El cablesado corresponden a las conexiones de los sensores y de los sistemas de refrigeración, calefacción y ventilación de las cámaras.



Imagen 2. Vista externa de la cámara termostatzada. Se observa los laterales de la cámara recubiertos con material aislante térmico, el cableado y la media sombra ubicado por encima de la tapa transparente.

2.2.2. Los sistemas de calefacción y refrigeración.

La temperatura fue manipulada dentro de cada cámara utilizando sistemas de calefacción o refrigeración. El sistema de calefacción consistió en una resistencia electrónica (Resistencia 15w 4,7 Ohm, Cosonic, China) montada sobre un soporte en el interior de la cámara y un ventilador 12 V para homogeneizar el aire del interior. El sistema de refrigeración consistió en dos placas Peltier (mod. TEC1-12706, 14 V 6A 40 × 40 × 3,8 mm, China) pegadas a la cara interna de las cámaras combinadas con un ventilador de 12 V. Las placas Peltier se adhirieron en su cara caliente a un disipador de calor sujeto a un lateral externo de la cámara por el cual circuló un flujo constante de agua ayudando a mejorar la capacidad de refrigeración del sistema (Imagen 3). Las cámaras del tratamiento control contuvieron sólo un ventilador de 12 v. Todas las cámaras estuvieron perforadas a los 3 cm para asegurar el intercambio adecuado de gas entre el interior de la cámara y la atmósfera circundante. Los laterales y las bases de las cámaras se cubrieron con material aislante térmico. A los 10 cm por encima de la cámara se colocó una tela de sombra (30% de transmisión) para reducir la radiación incidente y mejorar el control de la temperatura. Experimentos preliminares mostraron que la calefacción pasiva en cámaras sin media sombra ocasionaba daños irreversibles en la aceituna (provocando deshidratación y senescencia) con solo 1 h de exposición a la radiación directa durante el mediodía de un día despejado de verano en esta localidad. En las cámaras sombreadas no se encontró ningún indicador de daño por calor.

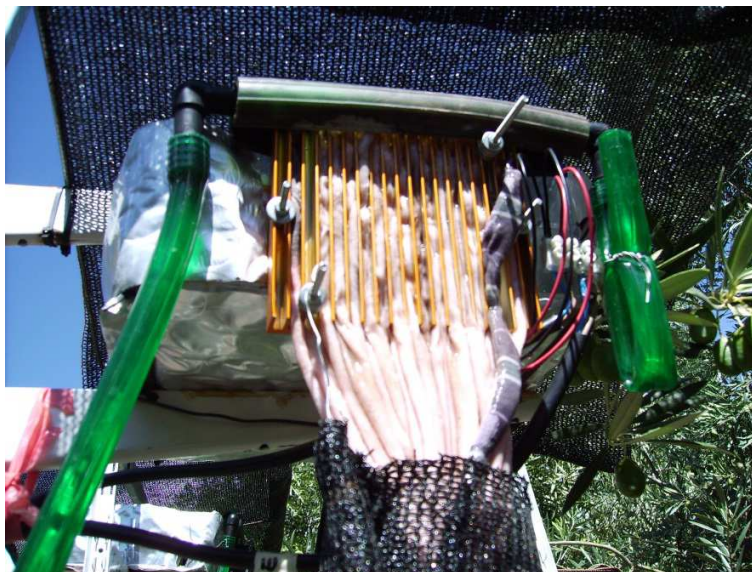


Imagen 3. Cámara de enfriamiento. Esta imagen muestra el lateral externo de la cámara donde se observa el disipador de calor (que está unido a la cara caliente del peltier) sujeto a un lateral externo de la cámara por el cual circuló un flujo constante de agua para mejorar la capacidad de refrigeración del sistema. El agua que goteaba era colectada en un bidón que tenía una bomba y permitía la recirculación del agua.

Para controlar la temperatura dentro de cada cámara se utilizó una central controladora electrónica (Caja controladora, Cavadevices, Argentina). Todas las cámaras contenían un sensor de temperatura (TC1047A, Microchip Inc., China) conectado al controlador electrónico que registra cada un minuto la temperatura del aire dentro de la cámara. El controlador regula el flujo de 12 V de corriente que alimenta a las placas Peltier y a las resistencias en respuesta a los datos de los sensores de temperatura. La central controladora se programó para que mantenga una diferencia fija de temperatura entre la cámara control y los tratamientos de manera que la temperatura copie la oscilación diaria de la temperatura ambiente.

2.2.3. Variables de respuesta

El índice de madurez de los frutos (IM) fue determinado en la cosecha intermedia (experimento de *un mes de duración*) y en la cosecha final (experimento de *un mes de duración* y *experimento de cuatro meses de duración*). El IM se calculó para cada muestra mediante el método de Uceda y Frías (1975) de evaluación visual de escala de color del fruto adaptado para muestras de menor número de frutos. Para el cálculo del peso seco los frutos se secaron en estufa a 60 °C hasta peso constante. La concentración de aceite se determinó sobre base seca utilizando la técnica de Soxhlet (IUPAC, 1992) con hexano

como solvente. La proporción de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía gaseosa, previa preparación de los esteres metílicos de los ácidos grasos en medio básico de acuerdo al método oficial COI (COI, 2013). La separación se efectuó mediante cromatografía gaseosa (PerkinElmer Pregisely Claurus 500, EE.UU) con columna capilar (ZB-WAX, Zebron USA) de 30 m con 0.25 mm ID y 0.25 micrones de Film Thickness. El inyector utilizado fue split y el detector FID, el gas portador fue hidrógeno, las temperaturas del inyector y detector fueron de 250 y 300 °C respectivamente. La temperatura del horno se programó a 180°C por 5 min, incrementando de 180° a 240 °C a razón de 5 °C por minuto y se mantuvo a 240 °C por 10 minutos. Cada uno de los ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico) se identificaron por comparación con los tiempos de retención de un estándar conocido (OACS-1, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y expresados como porcentaje del total.

2.2.4. Mediciones y experimentos complementarios

Para determinar el momento de la cosecha de los tratamientos de temperatura se siguió la dinámica de crecimiento del fruto y de la síntesis de aceite muestreando frutos de ramas de iguales características a las de los tratamientos y de los mismos árboles cada 15 días. Esto nos permitió seguir la dinámica de acumulación y determinar el período en que se alcanzaba la meseta en la concentración de estos parámetros. En 2011 se realizó un experimento complementario para evaluar los posibles efectos de la tela media sombra y / o la cámara sobre el peso seco, la concentración de aceite y la composición de ácidos grasos. Se seleccionaron tres ramas por árbol ($n = 4$) con los mismos criterios aplicados para las ramas experimentales. Una de las ramas creció con luz ambiente natural, otra estuvo bajo la misma tela media sombra utilizada en ambos experimentos, y la tercera rama fue encerrada en una cámara de control.

2.2.5. Análisis estadísticos

El efecto de los tratamientos para las variables respuestas medidas a cosecha final en el *experimento de cuatro meses de duración* y la cosecha intermedia del experimento de *un mes de duración* se evaluó utilizando un ANOVA de efectos fijos. Para evaluar el tratamiento y los efectos de período en la cosecha final en el experimento de *un mes de duración*, se utilizó un modelo mixto de ANOVA de tres factores, tratamiento, bloque y tratamiento \times tiempo, considerando al tratamiento como efecto aleatorio y el período como un efecto fijo. Las diferencias entre medias de los tratamientos se evaluaron con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Todos los análisis se realizaron utilizando el software SAS v8 (SAS Institute, Cary, NC, EE.UU. 1999).

En un análisis exploratorio, se compararon las respuestas del peso seco del fruto, la concentración de aceite y composición de ácidos grasos de aceite (porcentaje de ácido palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico) en función de la

temperatura media (es decir, 24 h), nocturna (8 p.m.-08 a.m.), y de las temperaturas diurnas (08 a.m.-8 p.m.). Se probaron diferentes modelos matemáticos (funciones lineales, cuadráticas y bilineales) para describir estas relaciones entre las variables. Las funciones lineales proporcionaron los mejores ajustes (valores de $R^2 > 0.60$) y pendientes significativamente ($P < 0.05$) diferentes de cero para todas las variables, excepto para peso seco del fruto. La relación peso seco del fruto con la temperatura media de crecimiento se describió mejor mediante el ajuste a una función bilineal, ajustado por el método de mínimos cuadrados. La relación de estas variables con la temperatura media diaria mostró ligeramente mejores ajustes que con las otras categorías de temperatura. En consecuencia, el informe de peso seco y respuestas de la calidad del aceite a la temperatura se formularon en función de la temperatura media diaria. Estos análisis y correspondientes figuras se realizaron con GraphPad Prism versión 5.01 del software (software GraphPadPrism, California, EE.UU.).

2.3. Resultados

2.3.1. La temperatura ambiente y la temperatura de los experimentos

La temperatura media estacional fue 19 °C en el *experimento de cuatro meses de duración* y 20 °C durante los cuatro períodos de tratamiento en el experimento de *un mes de duración*. Las temperaturas medias diarias disminuyeron a medida que avanzó la temporada, de 24 °C en enero a 11 °C en mayo, durante el *experimento de cuatro meses de duración*, y de 23 °C a 16 °C entre los mismos meses en el experimento de *un mes de duración* (Fig.2.1. a).

Los tratamientos modificaron las temperaturas medias estacionales dentro de las cámaras. Los tratamientos generaron un rango de temperaturas medias entre 16.7 °C y 30.7 °C en el *experimento de cuatro meses de duración* (Cuadro 2. 1). El incremento de la temperatura con respecto a T0 en el experimento de *un mes de duración* varió ligeramente entre períodos, en E-F se incrementó 6.2 °C y entre 7 °C y 7.3 °C en los tres períodos restantes (F-M, M-A, A-M) (Cuadro 2. 1). En ambos experimentos, las temperaturas medias del tratamiento T0 fueron aproximadamente 2 °C más elevados que la temperatura ambiente.

Cuadro 2.1: Duración del experimento, momento de aplicación, nivel térmico y temperatura media durante el tratamiento en el “*experimento de cuatro meses de duración*” y en el “*experimento de un mes de duración*”.

Nombre del experimento	Duración del tratamiento térmico	Momento de aplicación	Nivel térmico	Temperatura media durante el tratamiento (°C)
<i>Cuatro meses de duración</i>	4 meses	Enero- Mayo	T4-	16.70 \pm 0.3
			T0	20.61 \pm 0.3
			T5+	25.40 \pm 0.2
			T10+	30.73 \pm 0.6
<i>Un mes de duración</i>	1 mes	Enero- Febrero	T0	23.42 \pm 0.3
			T7+	29.61 \pm 0.4
		Febrero- Marzo	T0	22.40 \pm 0.3
			T7+	29.43 \pm 0.8
		Marzo-Abril	T0	21.44 \pm 0.4
			T7+	28.61 \pm 0.7
		Abril-Mayo	T0	16.22 \pm 0.4
			T7+	23.53 \pm 1.1

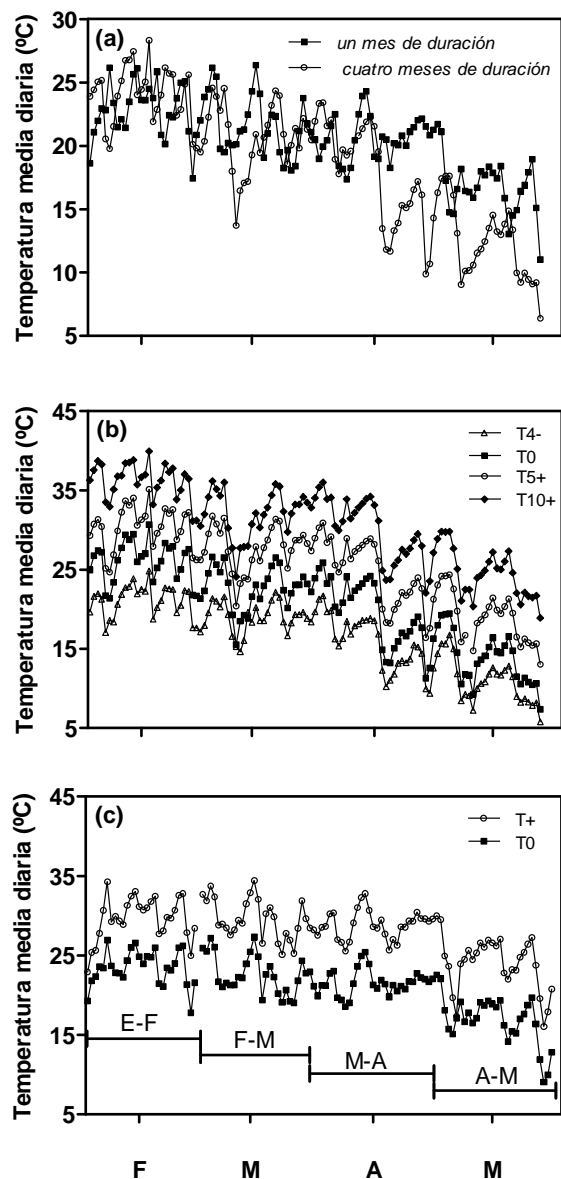


Fig.2.1. (a) Temperatura media diaria del ambiente durante el período de tratamiento en el experimento de *cuatro meses de duración* (2010) y en el experimento de *un mes de duración* (2009). (b) Temperatura media diaria de las cámaras durante el período de tratamiento del experimento de *cuatro meses de duración* (19 de enero a 13 de mayo, 2010). Los tratamientos aplicados fueron: control (T0), enfriamiento (T4-, 4 °C menos que T0) y dos niveles de calentamiento (T5+ y T10+, 5 y 10 °C más que T0 respectivamente). (c) Temperatura media diaria de las cámaras durante los períodos de tratamiento en el experimento de *un mes de duración* (13 de enero al 19 de mayo, 2009, delimitados con las líneas horizontales). Los tratamientos fueron control (T0), calentamiento (T7+; 6 a 7.3 °C más que T0). Cada punto representa la media (n=4), S.E no se muestra con el fin de clarificar la figura.

La temperatura dentro de las cámaras siguió el patrón estacional de la temperatura del aire, disminuyendo conforme avanzaba la temporada (compárese la Fig.2. 1 b y c con a). También, las temperaturas de tratamiento siguieron las fluctuaciones diarias como se ilustra en la figura 2.2 para un día del experimento de *cuatro meses de duración*. Las temperaturas máximas se registraron cerca de las 15 h y la mínima antes del amanecer. Las diferencias de temperatura entre los tratamientos fueron consistentes a lo largo de las 24 h del día (Fig.2. 2) y durante todo el experimento. Se observaron resultados similares para los cuatro períodos de tratamiento del experimento de *un mes de duración* (datos no mostrados). La calefacción pasiva de la cámara con media sombra fue suficiente para afectar significativamente ($P > 0.05$) la concentración de ácido oleico del aceite en el experimento complementario (Cuadro 2. 2). Por otra parte, el sombreado por sí solo no afectó la concentración de ácido oleico con respecto a la de la fruta de las ramas que crecieron en condiciones de luz natural. El peso seco del fruto y la concentración de aceite no fueron significativamente ($P > 0.05$) afectados por el sombreado o por la cámara y el sombreado (Cuadro 2.2).

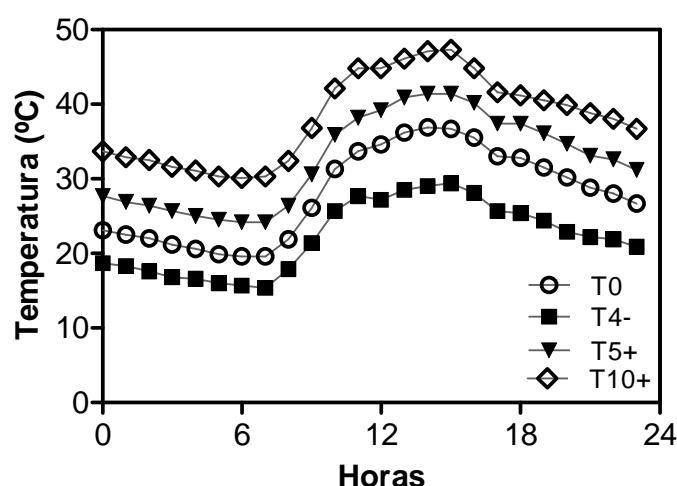


Fig.2. 2. Evolución de la temperatura diaria en las cámaras para el 7 de febrero de 2010 en el experimento de *cuatro meses de duración*. Los tratamientos aplicados fueron: control (T0), enfriamiento (T4-, 4 °C menos que T0) y dos niveles de calentamiento (T5+ y T10+, 5 y 10 °C más que T0 respectivamente). Cada punto representa el promedio ($n=4$), S.E no se muestra con el fin de clarificar la figura.

Cuadro 2.2. Efecto de la cámara y de la tela media sombra sobre el peso seco del fruto (g), la concentración de aceite (%) y la proporción de ácido oleico (%). Las ramas fructíferas crecieron en tres condiciones distintas: dentro de cámaras (iguales a las descritas para los experimentos *de un mes* o *de cuatro meses de duración*), fuera de la cámara pero cubierta con tela media sombra (de 30% de transmitancia) ó en condiciones lumínicas naturales. El tratamiento se aplicó entre el 1 de marzo y 10 de mayo de 2011. Los valores son promedios \pm 1 S.E (n=4). Estos datos corresponden al experimento complementario.

Condiciones de crecimiento	Peso seco (g)	Concentración de aceite (%)	Ácido Oleico (%)
Ambiente lumínico natural	1.71 \pm 0.13	31.82 \pm 4.69	74.91 \pm 0.60a
Media sombra	1.70 \pm 0.09	31.32 \pm 2.74	74.92 \pm 0.53a
Cámara + media sombra	1.69 \pm 0.26	37.10 \pm 3.34	72.54 \pm 0.73b

2.3.2. Dinámica estacional de la acumulación de materia seca, aceite y ácido oleico en frutos de ramas no tratadas

La dinámica estacional del peso seco del fruto, de la concentración de aceite y de la composición de ácidos grasos en las ramas no tratadas durante el *experimento de cuatro meses de duración* mostró un aumento del peso seco en el intervalo 30 - 116 DDEE, con un incremento lineal desde 0.75 g hasta 1.75 g. La concentración de aceite siguió una trayectoria similar, aumentando desde 17% hasta 44%, mientras que el porcentaje de ácido oleico cayó de 75% a 66% (Fig.2.3). La cosecha final se retrasó hasta 144 DDEE para asegurar que los frutos del tratamiento T4- alcancen su máximo peso seco. Como se muestra en la figura 2.3, el peso seco del fruto se estabilizó a partir de 116 DDEE.

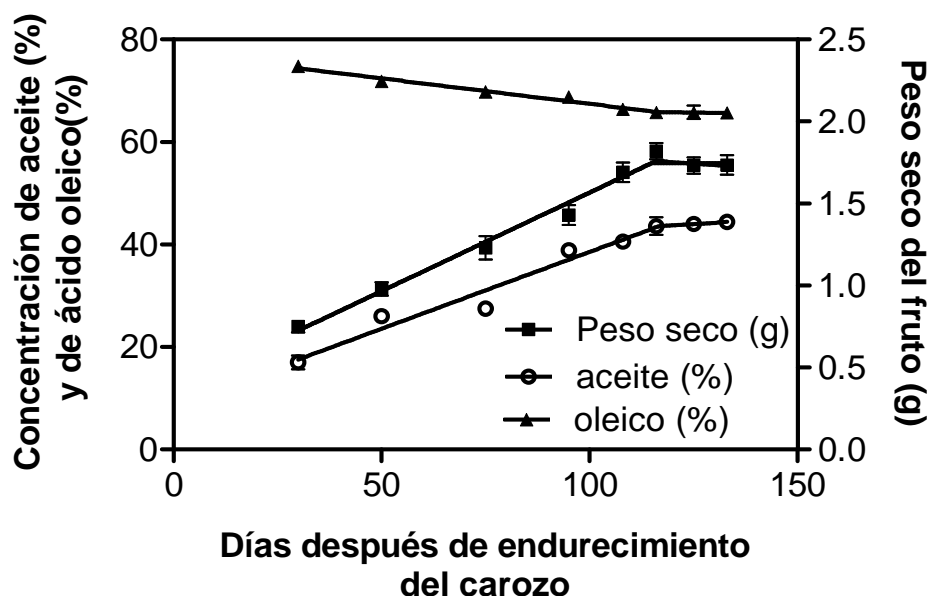


Fig.2. 3: Peso seco del fruto, concentración de aceite (%) y proporción de ácido oleico (%) en función de los días después de endurecimiento del endocarpo en *Olea europaea* L. var. Arauco (el cero corresponde al día que se registró el endurecimiento de carozo, 24 de diciembre de 2010) en el “*experimento de cuatro meses de duración*”. Los frutos se cosecharon de ramas sin tratar, pero en los mismos árboles y seleccionando tamaños y posiciones similares a las tratadas. Los símbolos son promedios ± 1 S.E (n= 4), S.E.s no se muestran cuando son más pequeños que el símbolo.

2.3.3. Efectos de la temperatura en el *experimento de cuatro meses de duración*

Los tratamientos se aplicaron ininterrumpidamente en el intervalo 30 -144 días después de endurecimiento del endocarpo (DDEE). En la cosecha, el IM (índice de madurez) fue similar para todos los tratamientos, alrededor de 1.5 ($P > 0.05$, datos no mostrados). El peso seco del fruto no se vio afectado por la temperatura en el rango 16-25 °C; por encima del mismo, el peso seco decreció $0.08 \text{ g } ^\circ\text{C}^{-1}$ (Fig.2.4. a). Por el contrario, la concentración de aceite del fruto fue más sensible a la temperatura, mostrando una caída de $1.1 \% ^\circ\text{C}^{-1}$ a lo largo de todo el rango de temperatura estudiado (Fig.2.4. b). En consecuencia, el contenido final de aceite por fruto ($\text{g de aceite fruto}^{-1}$) fue diferente entre los tratamientos, con $0.35 \text{ g de aceite fruto}^{-1}$ en el tratamiento T10 + y $0.80 \text{ g de aceite fruto}^{-1}$ en T4- ($P < 0.05$, datos no mostrados).

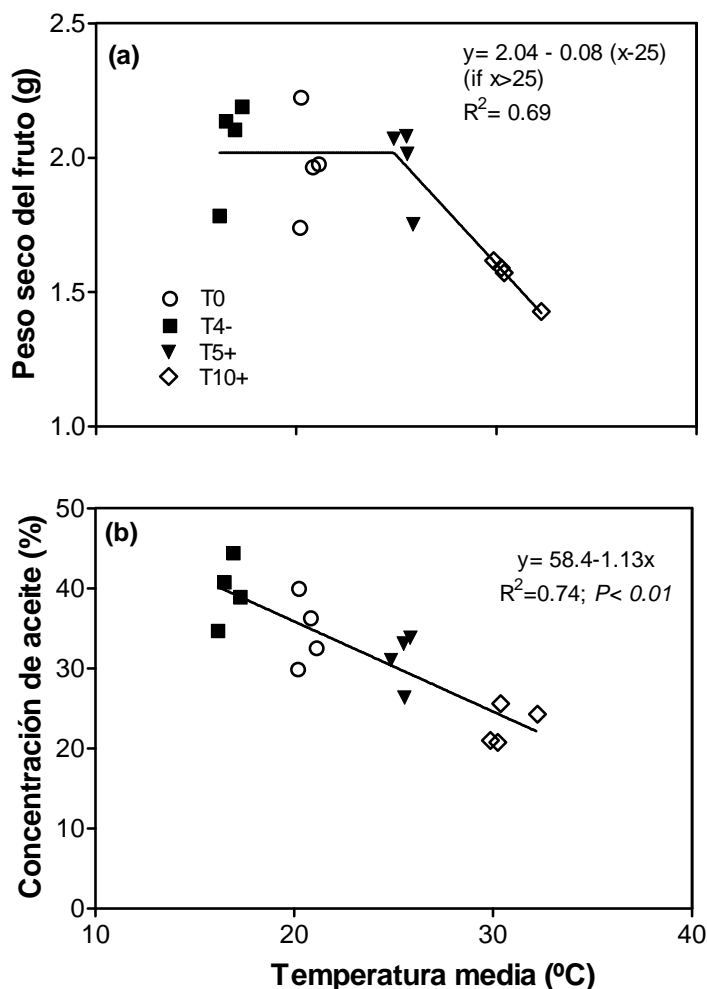


Fig.2. 4. Peso seco (a) y concentración de aceite (b) a cosecha final en función de la temperatura media durante el experimento *de cuatro meses de duración*. Los tratamientos fueron: control (T0 ○), enfriamiento (T4- ■) y dos niveles de calentamiento (T5+ ▼ y T10+ ◇). Cada valor corresponde a una cámara con control individual de temperatura.

La concentración de los diferentes ácidos grasos del aceite fueron modulados por la temperatura dentro del rango de temperaturas exploradas. La concentración de ácido oleico disminuyó linealmente 0.69 puntos porcentuales $^{\circ}\text{C}^{-1}$ (Cuadro 2. 3), con una diferencia de 11.2 puntos porcentuales entre los dos tratamientos de temperatura más extremos (es decir, T4- y T10 +) (Fig.2.5. a). Los ácidos grasos restantes: palmítico, palmitoleico, linoleico y linolénico aumentaron al incrementarse la temperatura, mientras que el ácido esteárico mostró una ligera disminución (Fig.2.5. b y c). El cambio en los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico fue de 0.2 y 0.05 puntos porcentuales $^{\circ}\text{C}^{-1}$, respectivamente (Cuadro

2. 3), mostrando un fuerte aumento en el ácido palmítico y una ligera disminución en esteárico (Fig.2. 5. b y c); mientras que el aumento de los ácidos grasos poli-insaturados (linoleico + linolénico) fue 0.36 puntos porcentuales $^{\circ}\text{C}^{-1}$ (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3. Funciones de ajustes lineales entre las temperaturas medias (TM) y las concentraciones de los ácidos grasos en el aceite de oliva en frutos cosechados al final de la estación de crecimiento. El tratamiento se inició 30 días después de endurecimiento del endocarpo, entre el 19 de enero y el 13 de mayo de 2010 (cosecha). Datos correspondientes al *experimento de cuatro meses de duración*.

Ácido graso	Ecuación de la regresión lineal	R ²	Valor P
Palmítico (16:0)	11.0 +0.20 x TM	0.81	<0.01
Palmitoleico (16:1)	0.3 +0.05 x TM	0.81	<0.01
Esteárico (18:0)	2.8 -0.01 x TM	0.31	<0.05
Oleico (18:1)	77.5 -0.69 x TM	0.77	<0.01
Linoleico (18:2)	7.4 +0.31 x TM	0.60	<0.01
Linolénico (18:3)	-0.2 +0.05 x TM	0.87	<0.01

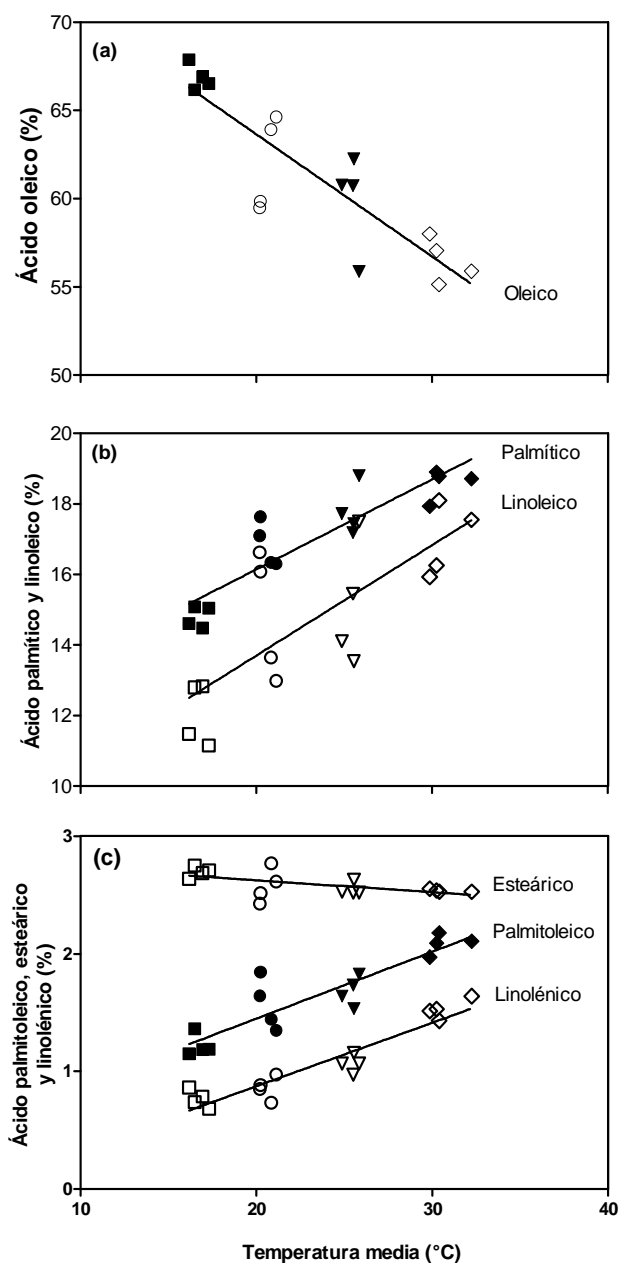


Fig.2. 5. Concentración de ácido oleico (a), ácidos palmítico y linoleico (b) y ácidos palmitoleico, esteárico y linolénico (c) en función de la temperatura media durante el experimento de *cuatro meses de duración*. Los tratamientos fueron: control (T0 ○), enfriamiento (T4- ■) y dos niveles de calentamiento (T5+ ▼ y T10+ ◇). Cada valor corresponde a una cámara con control individualizado de temperatura. Las funciones ajustadas se especifican en el Cuadro 2.3.

2.3.4. Efecto de la temperatura en el experimento de un mes de duración y la respuesta post-tratamiento

El peso seco del fruto no se vio afectado significativamente por el aumento de temperatura en el intervalo de 30 días en ninguno de los períodos tratados (Fig.2.6. a). Por otro lado, la concentración de aceite fue significativamente más baja ($P < 0.05$) en T7 + que en T0 cuando se aplicaron los tratamientos en E-F y M-A (Fig.2.6. b), y los efectos en los dos periodos de tratamiento restantes fueron consistentes con esta respuesta aunque no fueron estadísticamente significativos. El porcentaje de ácido oleico se redujo ($P < 0.05$) por la exposición a temperaturas más altas en los tres periodos de tratamiento más tempranos (Fig.2. 6. c).

Después de cada tratamiento de *un mes de duración*, una de las dos ramas tratadas continuó creciendo a temperatura ambiente hasta la cosecha final. La duración de este intervalo de post-tratamiento varió de 3 a 0 meses dependiendo del mes en que se aplicó el tratamiento. El peso seco final del fruto no se vio afectado significativamente ($P > 0.05$) por la exposición de un mes a altas temperaturas en ninguno de los cuatro periodos (Cuadro 2. 4). La exposición a temperaturas elevadas resultó perjudicial para la concentración final de aceite a cosecha final en todos los períodos de tratamiento ($P < 0.05$). El aumento de temperatura de 6.2 °C (T7 +) sobre T0 durante E-F provocó una caída de 6 puntos porcentuales en la concentración final de aceite de los frutos ($P < 0.05$), esto es llamativo teniendo en cuenta que el intervalo pos tratamiento durante el cual los frutos crecieron a temperatura ambiente hasta cosecha final fue de 3 meses. Además, la concentración final de aceite de los frutos cayó 3.5 puntos porcentuales para el tratamiento T7 + en F-M (55-80 DDEE), 6 puntos porcentuales en M-A (80-119 DDEE), y 3 puntos porcentuales en A-M (119-147 DDEE) en relación con T0 ($P < 0.05$). Estos resultados sugieren un efecto negativo persistente sobre la concentración de aceite en los frutos luego de la exposición a temperaturas elevadas. El aumento de la temperatura en el período E-F también alteró la proporción de ácidos grasos de la cosecha final; la concentración de ácido oleico fue 2.3 puntos porcentuales más baja y la del ácido linoleico 1.1 puntos porcentuales mayor en T7+ que en T0 ($P < 0.05$) (Cuadro 2.4). Estos efectos no fueron significativos para los posteriores períodos de exposición a alta temperatura. Las proporciones de ácido palmítico, esteárico y linolénico no se vieron afectados en ninguno de los cuatro periodos de tratamiento.

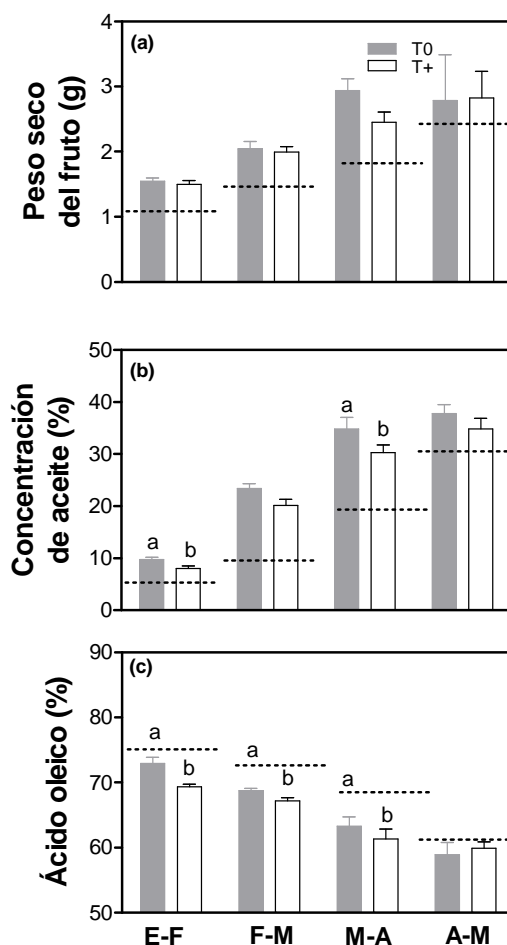


Fig.2. 6. Efecto del incremento de la temperatura (6-7 °C sobre la temperatura T0) durante los períodos de *un mes de duración* sobre el peso seco del fruto (a), la concentración de aceite (%) (b) y la concentración de ácido oleico (%) (c) de los frutos. La cosecha se realizó al retirar el tratamiento de *un mes de duración* en cada período. Los tratamientos fueron control (T0) y calentamiento (T7+), se aplicaron entre enero y mayo de 2009 (desde 24 a 147 DDEE). Las líneas punteadas indican los valores al inicio del período tratado. Las barras son promedio y las barra de error representan 1 S.E (n=4). Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (P<0.05) entre los tratamientos dentro de un período. Estos datos corresponden al *experimento de un mes de duración*.

Cuadro 2.4. Respuesta del peso seco del fruto, concentración de aceite y proporción de ácidos grasos a cosecha final (13 de Mayo) a la temperatura. El aumento de temperatura fue en el rango de 6.2 a 7.3 °C (tratamiento T7+) según el período de 30 días en el que se aplicó el tratamiento. Las ramas estuvieron en las cámaras termostatzadas por un mes, luego crecieron a temperatura ambiente hasta la cosecha final. T0 corresponde al tratamiento control. El período Enero- Febrero se inició 24 días después del endurecimiento de endocarpo. Los valores son promedio ± 1 S.E (n=4). Las letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos en cada periodo. Información del tratamiento de *un mes de duración*.

Periodo (meses)	Tratami- ento	Temperatura media (°C)	Peso seco (g)	Concentración de aceite (%)	Ácido Palmítico (%)	Ácido Estearico (%)	Ácido Oleico (%)	Ácido linoleico (%)	Ácido linolénico (%)
Ene-Feb									
	T0	23.4 \pm 0.3	2.2 \pm 0.2	38.5 \pm 1.8a	17.7 \pm 0.4	2.5 \pm 0.04	60.4 \pm 1.3a	15.5 \pm 1.2a	0.8 \pm 1.08
	T7+	29.6 \pm 0.4	2.0 \pm 0.3	32.6 \pm 3.3b	18.1 \pm 0.4	2.5 \pm 0.10	58.1 \pm 1.6b	16.6 \pm 1.5b	1.1 \pm 1.10
Feb-Mar									
	T0	22.4 \pm 0.3	2.6 \pm 0.4	40.9 \pm 2.7a	17.0 \pm 0.4	2.7 \pm 0.1	60.7 \pm 1.5	15.8 \pm 1.1	0.8 \pm 0.08
	T7+	29.4 \pm 0.8	2.1 \pm 0.1	37.4 \pm 2.3b	16.9 \pm 0.3	2.8 \pm 0.1	60.9 \pm 1.0	15.6 \pm 0.7	0.9 \pm 0.03
Mar-Abr									
	T0	21.4 \pm 0.4	2.8 \pm 0.3	44.5 \pm 1.5a	16.8 \pm 0.6	2.8 \pm 0.1	60.9 \pm 2.5	15.8 \pm 2.5	0.7 \pm 0.06
	T7+	28.6 \pm 0.7	2.2 \pm 0.1	38.5 \pm 2.6b	16.8 \pm 0.2	2.8 \pm 0.1	60.2 \pm 2.1	15.4 \pm 2.2	0.9 \pm 0.10
Abr-May									
	T0	16.2 \pm 0.4	2.8 \pm 0.7	37.8 \pm 1.7a	17.3 \pm 0.4	2.8 \pm 0.1	58.9 \pm 1.9	17.3 \pm 1.4	0.9 \pm 0.05
	T7+	23.5 \pm 1.1	2.8 \pm 0.4	34.8 \pm 2.0b	17.1 \pm 0.2	2.8 \pm 0.1	59.9 \pm 0.9	16.5 \pm 0.9	0.8 \pm 0.04

2.4. Discusión

El cultivo del olivo se expandió fuera de la zona de cultivo tradicional de la cuenca del mediterráneo, por eso resulta necesario ampliar la comprensión de las respuestas del cultivo a las nuevas condiciones ambientales. Esta nueva información puede ser útil para la predicción de los posibles cambios en la producción y calidad del aceite de oliva bajo escenarios de calentamiento global y para explicar las variaciones en la calidad del aceite que se observan en otras regiones. La exposición de 1 mes y 4 meses a temperaturas elevadas permitió una mejor comprensión de las respuestas del cultivo a este factor. Los aumentos de la temperatura en cualquiera de los intervalos de un mes, provocaron la reducción de la concentración de aceite a cosecha final, mientras que la proporción final de ácido oleico del aceite solo se afectó cuando la temperatura se incrementó en un momento temprano (Cuadro 2. 4). Sin embargo, se registró una disminución de estas variables al finalizar cada mes de exposición a alta temperatura (Fig.2. 6). El experimento de larga duración (cuatro meses) permitió conocer la respuesta a la temperatura del peso seco, la concentración de aceite y la proporción de ácidos grasos durante todo el período de acumulación de aceite (Figs. 2.4 y 2.5). Estos datos podrían ser aplicados para predecir variaciones en el rendimiento y en la calidad del aceite entre localidades y temporadas con distintos regímenes de temperatura para la var. 'Arauco'.

Los tratamientos térmicos siguieron la variación diaria y estacional generando condiciones más realistas que las temperaturas constantes frecuentemente usadas en cámaras de crecimiento. En otras especies frutales se han realizado experimentos manipulativos de la temperatura, donde se lograron pequeños aumentos de temperatura (1-2 °C) comparados con los controles (por ejemplo, Atkinson et al., 1998; Sadras et al., 2012). El sistema experimental utilizado en esta tesis permitió explorar un amplio rango de temperaturas (entre 16 °C y 32 °C de temperatura media durante el crecimiento) tal como se hizo anteriormente para cultivos oleaginosos de semillas (por ejemplo Chimenti et al., 2001). El diseño de la cámara permitió el crecimiento de dos ramas con 5-8 frutos cada una, lo que fue suficiente para cuantificar las variables medidas con precisión. Se podría argumentar que, debido a la tela media sombra, las hojas dentro de la cámara tuvieron tasas de asimilación de carbono más bajas que las hojas creciendo fuera de la cámara. Sin embargo, en experimentos en donde se puso a prueba el posible efecto de la media sombra no se encontraron diferencias con respecto a un tratamiento sin dicho recubrimiento para las variables peso seco o concentración de aceite (Cuadro 2. 2). Respecto a la tasa de asimilación neta de carbono en respuesta a la luz, la fotosíntesis de las hojas dentro de la cámara probablemente haya estado cerca del 50% de la fotosíntesis a saturación lumínica (Bongi y Long, 1987). También es posible que fotoasimilados de ramas cercanas hayan contribuido al crecimiento del fruto (Proietti, 2003).

Bajo las condiciones experimentales, el peso seco del fruto se mantuvo estable en un amplio rango de temperaturas medias (16-25 °C), pero fue afectado negativamente por temperaturas mayores a 25 °C (Fig.2.4 a). Esto es consistente con los

hallazgos de Trentacoste et al. (2012) basados en un análisis de dos estaciones de crecimiento para diez variedades de olivo. En dicho trabajo no encontró ninguna relación entre el peso fresco del fruto y la temperatura, aunque el rango de temperaturas medias estacionales exploradas fue estrecho (18.9-19.7 °C). Al abarcar un rango más amplio de temperatura, en el presente estudio tampoco se obtuvieron diferencias en la respuesta por debajo de 25 °C (Fig.2.4. a). Un estudio correlativo que analizó diferentes variedades y ambientes (un rango de temperaturas estacionales medias entre 23 °C y 27 °C) por 2 temporadas mostró que las variaciones en el peso seco final del fruto se explican mejor por las variaciones en la tasa de crecimiento que por la duración (Rondanini et al., 2014), no observándose relación entre la tasa de crecimiento del fruto y la temperatura. Futuros experimentos, que pongan a prueba si las relaciones entre las respuestas a la temperatura del peso seco del fruto que observamos (Fig.2.4., Cuadro 2.4) están vinculadas a las variaciones en la duración y la tasa de crecimiento del fruto permitirán entender esta respuesta. En otras especies se ha estudiado que tanto la tasa como la duración se modificaron con la temperatura (de girasol, Chimenti et al., 2001; Rondanini et al., 2006; soja, Egli y Wardlaw, 1980; trigo, Wardlaw y Moncur, 1995; manzana, Atkinson et al., 1998; Warrington et al., 1999). El peso seco de los frutos en los tratamientos control variaron entre años (Cuadro Fig.2.4. a y Cuadro 2.4), pero no se encontraron diferencias significativas en el peso seco de los frutos con las ramas no tratadas (datos no presentados). Estas variaciones interanuales en el peso seco del fruto observado en los tratamientos T0 podrían deberse a diferencias en la subfase de crecimiento del fruto en el que se aplicaron los tratamientos y a la duración de los experimentos.

La concentración de aceite fue sensible a los aumentos de temperatura durante el período de activa acumulación de aceite, tanto en largos (Fig.2. 4. b) como en cortos (Fig.2. 6.b, Cuadro 2.4) períodos de exposición a temperaturas mayores. La concentración de aceite disminuyó 1.13 puntos porcentuales al incrementarse la temperatura en el rango de 16 y 32 °C. Este hallazgo es consistente con los resultados de un análisis correlativo donde la acumulación de aceite se analizó para 6 variedades, en tres localidades y más de dos años (Rondanini et al., 2014), mostrando que la concentración de aceite del fruto se asoció negativamente con la temperatura media. Trentacoste et al. (2012) en un trabajo de correlación también encontró una relación negativa entre la duración de la acumulación de aceite en el fruto de olivo y la temperatura máxima diaria, dentro de un estrecho rango de temperaturas exploradas (29 a 31.5 °C). Esta tesis permitió el estudio del efecto de la temperatura excluyendo otros factores que podrían estar influyendo en la respuesta de los análisis correlativos, permitiendo sugerir que la temperatura es un factor crucial para la determinación del rendimiento y la calidad de aceite. En este capítulo se mostró el efecto negativo del incremento de la temperatura durante la mayor parte de la subfase de acumulación de aceite de mesocarpo y fue confirmado por los resultados del experimento de *un mes de duración*. En forma llamativa, la reducción de la concentración de aceite después de una exposición corta (un mes) a una temperatura más alta que T0 persistió hasta la cosecha final después de tres (exposición E-F), dos (exposición F-M) o un (exposición M-A)

meses a temperatura ambiente (Cuadro 2.4). La exposición durante E-F produjo la mayor caída en la concentración de aceite en la cosecha final, a pesar de que sólo se había sintetizado el 12% del contenido final de aceite (g de aceite fruta⁻¹) (Fig.2.6. b). Estos resultados son consistentes con las observaciones en girasol donde la concentración de aceite a cosecha final se redujo cuando la temperatura fue > 35 °C durante 7 días en la fase temprana de acumulación de aceite (Rondanini et al., 2003).

Poco se sabe acerca de la actividad enzimática o la expresión de genes ligados a la biosíntesis de lípidos en el fruto de olivo. Actualmente se conoce que al aumentar la temperatura de 20 a 30 °C en cultivos de callos de olivo se aceleró el pasaje de diacilglicerol a triacilglicerol (TAG) (Ramli et al., 2002), pero aumentos mayores de temperatura redujeron fuertemente la síntesis de TAG en mesocarpio de olivo (Salas et al., 2000). También la temperatura podría estar regulando procesos indirectamente vinculados con la síntesis de aceite, como la fotosíntesis o la respiración del fruto que podrían estar contribuyendo a la disminución de la concentración de aceite al aumentar la temperatura. Aunque no se midió en nuestros experimentos, es probable que la fotosíntesis haya sido afectada negativamente por la exposición a altas temperaturas en hojas y en frutos verdes. Se ha informado que temperaturas de la hoja por encima de 32 °C provocan una disminución en la tasa fotosintética (Bongi y Long, 1987). Al mismo tiempo, la respiración podría aumentar con la temperatura ya que el fruto exhibe una activa tasa respiratoria durante la maduración (Ranalli et al., 1998). Es necesario seguir trabajando para aclarar las posibles relaciones causales entre la respuesta de la concentración de aceite a la temperatura y los procesos involucrados.

El perfil ácido del aceite está determinado por el genotipo aunque factores ambientales también pueden modificarlo. Se han informado diferencias entre variedades en la dinámica de la concentración de ácido oleico durante la acumulación de aceite, bajo las condiciones climáticas del NOA (Rondanini et al., 2014), observando un efecto directo de la temperatura sobre la proporción de ácidos grasos del aceite en la var. 'Arauco' (Fig.2. 5). En dicha variedad, al igual que en Arbequina, se encontró una fuerte disminución en la concentración de ácido oleico al avanzar la temporada sugiriendo que ambas variedades responderían de manera similar a la temperatura (Rondanini et al., 2014). Es probable que exista variabilidad en la respuesta entre variedades; esta posibilidad se sustenta en las diferencias en los niveles de expresión de genes que codifican para FAD encontradas en respuesta a factores ambientales en distintas variedades (Hernández et al., 2009, 2011). Estudios previos sugirieron una correlación negativa entre la proporción de ácidos grasos y la temperatura basados en diferentes ubicaciones geográficas o años (Mailer et al., 2010; Ceci y Carelli, 2010; Rondanini et al., 2011; Lombardo et al., 2008; Orlandi et al., 2012). El aumento de temperatura redujo la concentración de ácido oleico 0.69% °C⁻¹ y aumentó la de palmítico, palmitoleico, linoleico y linolénico, mientras que hubo una ligera reducción de esteárico (Cuadro 2.3). Por otra parte, se encontró que los períodos de 30 días a alta temperatura fueron suficientes para reducir la proporción de ácido oleico en el final del tratamiento en los tres períodos más tempranos (Fig.2.6. c). Este efecto se revertió al retirar el tratamiento de alta temperatura, excepto cuando se aplicó en E-F donde el

efecto persistió (Cuadro 2. 4). Un "efecto memoria" similar fue reportado para la proporción de ácido oleico en el girasol después de un tratamiento temprano en el período de crecimiento del fruto (desde la floración hasta 200 °C día, temperatura base 6 °C), aunque el signo de la respuesta fue opuesto al encontrado en olivo (Izquierdo et al., 2002).

Es importante resaltar el contraste en las respuestas del ácido oleico a la temperatura entre olivo y los cultivos oleaginosos de semillas. Por ejemplo, la reducción observada en la expresión de FAD en respuesta a la exposición a altas temperaturas (35°C) por corto plazo (24 h) en olivo fue consistente con las respuestas que se encontraron en los cultivos que acumulan aceite principalmente en semilla (Hernández et al., 2011), pero contrario a lo observado en olivo en respuesta a altas temperaturas prolongadas o en estudios de correlación. Por lo tanto, es posible que el mecanismo por el cual la temperatura modula la composición de ácidos grasos en el mesocarpo de olivo a campo se explique mejor por los cambios post-transcripcionales y / o por la disponibilidad de sustratos. Los resultados de este estudio podrían ser un punto de partida para futuras investigaciones que podrían ayudar a entender el mecanismo detrás de esta novedosa respuesta del ácido oleico a la temperatura en frutos de olivo. Algunos potenciales interrogantes son: 1) El aceite de semilla del olivo mostrará una respuesta de la proporción de ácidos grasos a la temperatura similar a la de los cultivos de oleaginosas de semilla? 2) Los cultivos que acumulan aceite en mesocarpo (por ejemplo, palta o palma aceitera) muestran una respuesta de la calidad del aceite similar a la del aceite de oliva? Además, en los aceites de oleaginosas de semilla se ha demostrado que las temperaturas nocturnas (mejor que las temperaturas medias) son las que mejor explican la composición de ácidos grasos (girasol: Izquierdo et al., 2006; Pereyra-Irujo y Aguirrezábal, 2007; soja: Gibson y Mullen, 1996). Los resultados presentados en estos trabajos se basan en aumentos en la temperatura durante las 24h (donde la temperatura del día y de la noche covarían). Otros experimentos en los que las temperaturas diurnas y nocturnas sean manipuladas de manera independiente serán adecuados para resolver estos interrogantes.

En resumen, en los dos experimentos que se presentaron en este capítulo se manipuló la temperatura durante el crecimiento del fruto de olivo demostrando que la misma temperatura (en el rango de 16-32 °C) durante el crecimiento del fruto impacta negativamente sobre la concentración de aceite de la fruta y la proporción de ácido oleico en el aceite. Los distintos momentos de exposición, de un mes de duración a elevadas temperaturas, redujeron la concentración de aceite al igual que el tratamiento de cuatro meses de duración, pero los cambios en la proporción de ácido oleico se produjeron cuando las exposiciones ocurrieron en las primeras etapas de la acumulación de aceite. Estos resultados sugieren la existencia de algún efecto persistente de las altas temperaturas luego de retirado el tratamiento. El peso seco del fruto no se modificó con exposiciones prolongadas a las temperaturas en el rango de 16 a 25 °C, pero temperaturas mayores provocaron una fuerte caída de peso seco. Las exposiciones a corto plazo no provocaron ninguna respuesta en el peso seco del fruto. Los resultados obtenidos en este capítulo y los antecedentes basados en estudios de correlación

corroboraron que las respuestas de la proporción de ácidos grasos del aceite de oliva a la temperatura son diferentes a las que se encuentran en las especies oleaginosas de semillas.

En el Capítulo siguiente (Cap. III) se presentarán los resultados del experimento en el que se estudiaron los efectos de la temperatura sobre el peso seco, la concentración de aceite y la proporción de ácidos grasos en los aceites de la semilla y del mesocarpo de manera independiente. Los resultados de este experimento permitieron conocer las respuestas a la temperatura de las dos estructuras del fruto (mesocarpo y semilla) que acumulan aceite en olivo. Además permitieron comparar las respuestas de ambas estructuras del fruto con las conocidas para oleaginosas de semilla anuales.

Capítulo III

Efectos de la temperatura sobre el peso seco, la concentración de aceite y la proporción de ácidos grasos de los aceites del mesocarpo y la semilla de olivo (*Olea europaea* L. var. 'Arauco').

Capítulo III

Efectos de la temperatura sobre el peso seco, la concentración de aceite y la proporción de ácidos grasos de los aceites del mesocarpo y la semilla de olivo (*Olea europaea* L. var. 'Arauco').

3.1. Introducción

El aceite de oliva se extrae principalmente del mesocarpo (epicarpo y mesocarpo carnoso, ~ 95%) con una pequeña contribución de la semilla (endospermo y el embrión, ~ 5%) (Conde et al., 2008). Dentro de la semilla, la mayor proporción de aceite está presente en el embrión (Rapoport y Gómez del Campo, 2008). El crecimiento del fruto dura 4-6 meses aproximadamente, tiempo en el cual la semilla y el mesocarpo tienen un crecimiento asíncrono. La semilla completa su crecimiento al momento que el mesocarpo sólo ha alcanzado la mitad de su peso final. Dentro de la fase de crecimiento del fruto, dos sub-fases se pueden distinguir basado en la intensidad de la división celular (Hammami et al., 2011). El período 1 (de floración a 8 semanas después de la floración) se caracteriza por la división celular activa. Durante este período se generan aproximadamente el 66% del número final de células y se alcanza el 25% del tamaño final de la célula, mientras que el área transversal del fruto alcanza un 34% de su valor final. Durante el periodo 2 (de 8 a 32 semanas después de la floración) la tasa de división celular es más baja y ocurre el aumento del 75% del tamaño de las células. Al mismo tiempo, el área transversal del endocarpo (que incluye la semilla) se expande de manera exponencial desde el inicio de floración hasta 8 semanas después de la misma, mientras que la sección transversal del mesocarpo se incrementa constante y sustancialmente, desde la floración hasta el inicio de la madurez (28 semanas después de la floración).

El origen parental de los tejidos del mesocarpo y la semilla es diferente. El pericarpo (incluyendo epicarpo, mesocarpo y endocarpo) se forma a partir de los tejidos del ovario de la flor (tejidos maternos), mientras que la mayoría de los tejidos de las semillas se generan después de la fecundación. Además, las funciones adaptativas del mesocarpo y semillas difieren. El mesocarpo contribuye a la dispersión de la fruta, mientras que la semilla es el órgano reproductor que contiene almacenados compuestos carbonados que nutren la plántula. Respecto al almacenamiento de aceite se conocen algunas diferencias entre estos órganos. El aceite de semilla contiene oleosina, una proteína que típicamente está presente en el aceite de semillas oleaginosas anuales (por ejemplo, girasol, cártamo, maíz, soja, colza, etc) (Tzen et al., 1990), pero que no se encuentra en el aceite de mesocarpo de olivo (Ross et al., 1993). Respecto a la proporción de ácidos grasos de los aceites de mesocarpo y semillas de olivo, una

revisión temprana (Hilditch, 1964) informó proporciones similares de algunos ácidos grasos en ambos tejidos. El ácido palmítico constituyó el 7-15% de los ácidos grasos en el aceite de mesocarpio y 6% en el aceite de las semillas, mientras que para oleico las proporciones fueron 70-85% y 83%, y para linoleico 4-12% y 7% en aceites de mesocarpio y semillas, respectivamente. A nivel molecular, algunos estudios realizados en frutos de olivo revelaron que hay diferencias en los niveles de expresión y en los momentos en los que se expresan los genes que codifican para la enzima desaturación de ácidos grasos (ω -6 desaturasas) durante el crecimiento del fruto (Banilas et al., 2005; Poghosyan et al., 1999). En contraste con el considerable cuerpo de información sobre las diferencias adaptativas, estructurales y enzimáticas entre estas dos estructuras que acumulan aceite en el fruto de olivo, hay poca información relativa a los efectos de la temperatura sobre la actividad enzimática o expresión de genes que codifican para enzimas desaturasas que finalmente intervienen en la definición de la proporción de ácidos grasos del aceite.

Estudios correlativos en olivo han demostrado que el peso seco del fruto se relaciona fuertemente con la tasa de crecimiento de la fruta y en menor medida con la duración del crecimiento (Rondanini et al., 2014; Trentacoste et al., 2012), pero el papel de los factores que controlan estas repuestas, como podría ser la temperatura, son inciertos. Un estudio mostró que la manipulación de la temperatura afectó el peso seco del fruto con temperaturas medias superiores a 25 °C, pero no se detectaron cambios con temperaturas menores (entre 16 y 25 °C) (Capítulo II de esta tesis). En girasol, una oleaginosa de semilla, la temperatura aumenta la tasa de crecimiento del embrión hasta un máximo (25 °C) mientras que la duración del período de crecimiento disminuye a medida que aumenta la temperatura (Chimenti et al., 2001). En olivo, el peso del fruto es importante por su relación con el calibre de fruta cuando el destino es la aceituna de mesa, mientras que la acumulación de aceite es un factor determinante para la producción de aceite. Evidencia correlativa tomando diferentes variedades, años y localidades que existe una relación negativa entre la concentración de aceite del fruto y la temperatura media diaria durante la temporada (23 a 27.5 °C) (Rondanini et al., 2014.). Además, la concentración de aceite del fruto en la var. ‘Arauco’ disminuyó 1.1% por °C de incremento de la temperatura en un experimento manipulativo de la temperatura (Capítulo II de esta tesis).

La proporción de ácidos grasos es un atributo importante de los aceites comestibles y para el aceite de oliva está reglamentado por el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2013). Para calificar el aceite de oliva como virgen extra, los niveles de ácido oleico en el aceite deben estar dentro de los límites de 55 y 83%, los de palmítico entre 7.5 y 20%, los de linoleico entre 3.5 y 21% y el de linolénico debe ser \leq 1%. La proporción de ácidos grasos del aceite está determinada por el genotipo -la variedad- (Uceda y Hermoso, 2001), pero el ambiente y las interacciones genotipo x ambiente pueden modificarla (Rondanini et al., 2011). La temperatura es uno de los factores ambientales que modulan la proporción de ácidos grasos en el aceite de oliva y otros cultivos de semillas oleaginosas. Hay evidencias de tipo correlativa (Lombardo et al., 2008; Mailer et al., 2010; Orlandi et al., 2012; Rondanini et al., 2014) y

antecedentes manipulativos de la temperatura en el campo (Capítulo II) que muestran que el ácido oleico del aceite del fruto entero disminuye a medida que aumenta la temperatura. Esta respuesta es opuesta a la descripta para cultivos que acumulan aceite en la semilla. En girasol (Canvin 1965), maíz y soja (Zuil et al., 2012 y referencias allí citadas) las altas temperaturas durante el crecimiento del fruto producen un aumento en la concentración de ácido oleico. Esta respuesta diferencial a la temperatura podría estar dada por las diferentes estructuras del fruto en cuestión (mesocarpo principalmente en aceite de oliva y semilla en los cultivos oleaginosos tradicionales). El objetivo del estudio descrito en este capítulo fue determinar el efecto de la temperatura sobre los pesos secos, las concentraciones de aceite y las proporciones de ácidos grasos en los aceites de la semilla y del mesocarpo de olivo. Para ello, se aprovechó el hecho de que la acumulación de aceite de la semilla se completa aproximadamente a la mitad de la fase de crecimiento del fruto, mientras que el aceite se sigue acumulando en el mesocarpo hasta la maduración de la fruta.

3.2. Métodos

3.2.1. Sitio experimental y tratamientos de temperatura

El experimento se llevó a cabo en 2011 en Los Molinos (28 ° 43 'S, 66 ° 56' W, 1400 m sobre el nivel del mar), provincia de La Rioja, Argentina. El olivar donde se desarrolló el experimento fue el mismo que el descrito en capítulo II (apartado 2.2.1) donde se describió el sitio experimental y las características de la plantación. El riego fue por inundación cada 20 días durante todo el año, y los árboles se fertilizaron con 40 kg de estiércol de cabra por planta en la fase de endurecimiento del carozo. Se utilizó la variedad 'Arauco' (Barranco et al., 2000). La plena floración se registró el 24 de octubre y el endurecimiento de carozo el 30 de diciembre. Este último se consideró que había ocurrido cuando no fue posible atravesar el endocarpo del fruto con un cuchillo afilado.

El experimento de manipulación de la temperatura involucró a cada una de las dos subfases de crecimiento del fruto por separado. El período A, desde el 25/11/ 2010 a 23/02/ 2011, cubrió la mayor parte del período de acumulación de aceite en la semilla y el inicio de acumulación de aceite en el mesocarpo. El período B, desde el 01/03/2011 hasta 13/05/ 2011, cubrió la segunda mitad de la subfase de acumulación de aceite en el mesocarpo. Estos períodos de tratamiento fueron seleccionados para investigar las posibles respuestas diferenciales a la temperatura de las dos estructuras del fruto que acumulan aceite: semilla y mesocarpo. En cada uno de los dos períodos se aplicaron cuatro niveles térmicos usando las cámaras termostatzadas descriptas en el Cap. II: un control a temperatura ambiente (T0), dos niveles de calentamiento (5 °C y 10 °C más caliente que el control; T5+ y T10+ respectivamente), y un nivel de enfriamiento (3 °C más frío que la de control; T3-). El diseño experimental fue de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, donde un árbol fue tomado como un bloque, y cada tratamiento estuvo presente dentro de cada bloque. Una vez finalizado el período A, las cámaras fueron transferidas a otras ramas del mismo árbol para comenzar el tratamiento del período B. En ambos períodos, se seleccionaron ramas fructíferas del casquete

externo de la copa de alrededor de 20 cm de longitud con 5-8 frutos por rama. La orientación de las ramas fue Sur ($\pm 25^\circ$) y las mismas se ubicaron a 2-3 m de altura. Las ramas fueron encerrados en cámaras de acrílico de 22 x 22 x 10 cm (largo, ancho y alto, respectivamente) durante el período de tratamiento. Los laterales y base de las cámaras se cubrieron con material aislante y se colocó una tela de sombra (30% de transmitancia) a 10 cm por encima de la tapa. La media sombra redujo la carga de radiación de manera de mejorar el control de la temperatura y evitar picos de temperaturas extremas que quemasen los frutos desencadenando la senescencia. La relación hoja / fruto en las ramas seleccionadas se ajustó mediante raleo cuando fue necesario para garantizar una relación fuente / destino uniforme a través de todas las ramas utilizadas en el experimento. La temperatura del aire en el interior de cada cámara individual se registró cada 15 minutos utilizando sensores de temperatura conectados a un almacenador de datos (datalogger, Cavadevices, Argentina).

3.2.2. Los sistemas de calefacción y refrigeración

La temperatura fue manipulada dentro de cada cámara utilizando sistemas de calefacción o refrigeración. Las cámaras y el sistema de calefacción / refrigeración fueron idénticos a las descritas en el Capítulo II. Brevemente, se utilizó un controlador electrónico central (Caja controladora, Cavadevices, Argentina) para controlar la temperatura de cada cámara en forma individual. Todas las cámaras contenían un sensor de temperatura (TC1047A, Microchip Inc., China) conectado al controlador electrónico que registra la temperatura del aire dentro de la cámara cada 15 minutos. El controlador regulaba el flujo de corriente de 12 V que alimenta a la placa Peltier o a las resistencias en respuesta a las temperaturas medidas en el tratamiento control en función de las diferencias térmicas pre- establecidas con las respectivas cámaras del tratamiento control. Esto garantizó que las temperaturas dentro de las cámaras oscilaran copiando el ciclo diario de la temperatura ambiente y, al mismo tiempo, mantuvieran el diferencial de temperatura pre-fijado con la cámara de control.

3.2.3. Variables respuesta

Los frutos fueron cosechados al final de cada período de tratamiento. Se registró el peso seco del fruto entero y luego se disectó el mismo en sus estructuras constitutivas (mesocarpo, endocarpo y semilla) para su posterior análisis por separado. Se registró el peso fresco de cada estructura, y luego se lo secó en horno a 60°C hasta peso constante. Las técnicas de extracción del aceite y de determinación de los ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico) fueron iguales a los detallados en el Capítulo II. Las variables respuesta presentados para el período B corresponden a la diferencia entre los valores obtenidos al momento de cosecha (una vez finalizado el tratamiento) y los valores obtenidos al cosechar frutos de ramas similares a las tratadas (seleccionadas con el mismo criterio posicional y de relación fruto/hoja) al inicio del

tratamiento (1 de marzo). Esto permitió informar los efectos de los tratamientos en función del aceite acumulado en el transcurso del período de tratamiento, evitando el efecto de dilución generado por la biomasa y aceite que se habían acumulado en las estructuras del fruto previo al inicio del período B.

3.2.4. Análisis estadístico

Los efectos del tratamiento sobre las variables respuesta medidas en los períodos A y B se evaluaron mediante ANOVAs de efectos fijos. Las diferencias entre medias de los tratamientos se evaluaron con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Todos los análisis se realizaron utilizando el software SAS v8 (SAS Institute, Cary, NC, EE.UU. 1999). Se ajustaron diferentes funciones matemáticas (lineal, polinomial y bilineales) a las relaciones entre las variables de interés. Elegí aquellas funciones que proporcionaron los mejores ajustes con un modelo significativo ($P < 0.05$). Estos análisis y los gráficos se realizaron con software GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad Prism Software, California, EE.UU.).

3.3. Resultados

3.3.1. Las temperaturas ambiente y en las cámaras de temperatura controlada

La temperatura media del aire durante el período A (25 /11/2010 hasta 23 /02/ 2011) fue de 21.4 °C, mientras que durante el periodo B (1 /03/ hasta 13 /05/, 2011) fue 15.2 °C. Este descenso fue producto del avance del otoño durante el período B. Las temperaturas medias diarias estacionales dentro de las cámaras fueron cercanas a las programadas, de manera que las diferencias entre T0 y los tratamientos se mantuvieron durante toda la temporada. Las temperaturas medias resultantes abarcaron rangos entre 20.1 °C y 30.3 °C en el período A y entre 15.6 °C y 27.2 °C en el período B (Fig.3.1). Los diferenciales de temperatura relativos a T0 variaron ligeramente entre los períodos, siendo 4 °C y 7 °C en T5 + y T10 +, respectivamente, en el período A, y 6 °C y 10 °C en T5 + y T10 + en período B. Respecto a T3 -, fue de 3 °C por debajo de T0 en el período A y 1,5 °C en el período B.

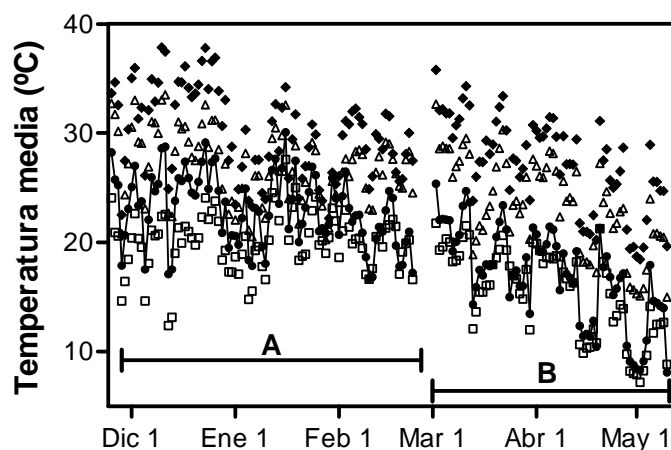


Fig. 3.1. Temperaturas medias diarias de las cámaras durante la aplicación del tratamiento en el período A (25 noviembre 2010 hasta 23 febrero 2011) y el período B (marzo 1-mayo 10, 2011). Los tratamientos fueron: control (T0 ● y línea continua), refrigeración (T3-□; 3 ° C más fría que T0), y dos niveles de calefacción (T5 + Δ y T10 + ◇, 5 y 10 ° C mayor que T0, respectivamente). Las líneas horizontales indican los períodos de tratamiento. Cada punto representa la media (n = 4), los valores de S.E no se muestran para lograr mayor claridad de la figura.

Las temperaturas medias diarias dentro de las cámaras siguieron los patrones día/noche (Fig.3. 2) y estacionales de variación de la temperatura del aire (Fig. 3.1). Durante el día, la temperatura alcanzó su valor máximo en torno a las 15 horas del tiempo solar y el mínimo antes del amanecer (Fig.3.2.). Las diferencias de temperatura entre los tratamientos fueron consistentes a lo largo de cada período de 24 h durante todo el experimento.

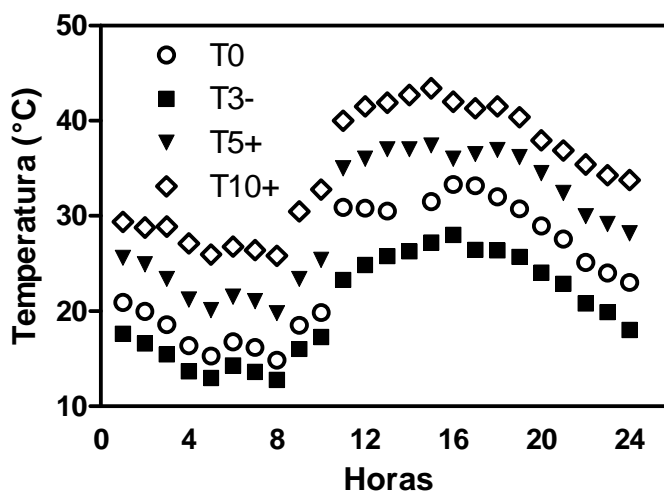


Fig. 3.2. Evolución diaria de la temperatura para los cuatro niveles térmicos para el día 20 de febrero de 2011. Cada punto representa la temperatura media horaria. Los tratamientos fueron: control (T0 ○), refrigeración (T3-■; 3 ° C menos que T0), y dos niveles de calefacción (T5 + ▼ y T10 + ◇, 5 y 10 ° C más que T0, respectivamente).

3.3.2. Dinámica de crecimiento estacional del mesocarpo y la semilla en ramas no tratadas

La dinámica de acumulación del peso seco en el mesocarpo, endocarpo y semilla de los frutos (en ramas no tratadas) durante los períodos A y B mostraron que estas tres estructuras tienen diferentes patrones temporales y alcanzaron sus máximos pesos secos en diferentes momentos (Fig. 3.3 a). El peso seco del endocarpo aumentó a alta tasa hasta 50 días después del endurecimiento del endocarpo (DDEE), luego de lo cual tuvo un pequeño incremento adicional. El peso seco de la semilla registró un claro aumento hasta 77 DDEE, los incrementos posteriores fueron muy bajos (por ejemplo, 0.01 g de incremento de 77 a 130 DDEE al analizar frutos creciendo fuera de la cámara). El peso del mesocarpo representó el 70% del peso seco final del fruto y creció activamente desde endurecimiento endocarpo hasta 117 DDEE, abarcando ambos períodos de tratamiento. Durante el período A la acumulación de aceite y el peso seco del mesocarpo aumentaron activamente; luego, la deposición de aceite mostró una fase lag en el comienzo del período B (entre 56 y 77 DDEE) que no fue visible en el patrón de acumulación de peso seco (Fig. 3.3. b). Al final del período A, el mesocarpo había acumulado el 50% del peso seco final y el 52% del aceite. La concentración de aceite en la semilla no se muestra para las dos primeras fechas de cosecha (-21 y -7 DDEE) debido al tamaño pequeño de la muestra. La concentración de aceite de la semilla llegó a su máximo antes de los 50 DDEE, siguiendo un patrón de crecimiento muy similar al del endocarpo.

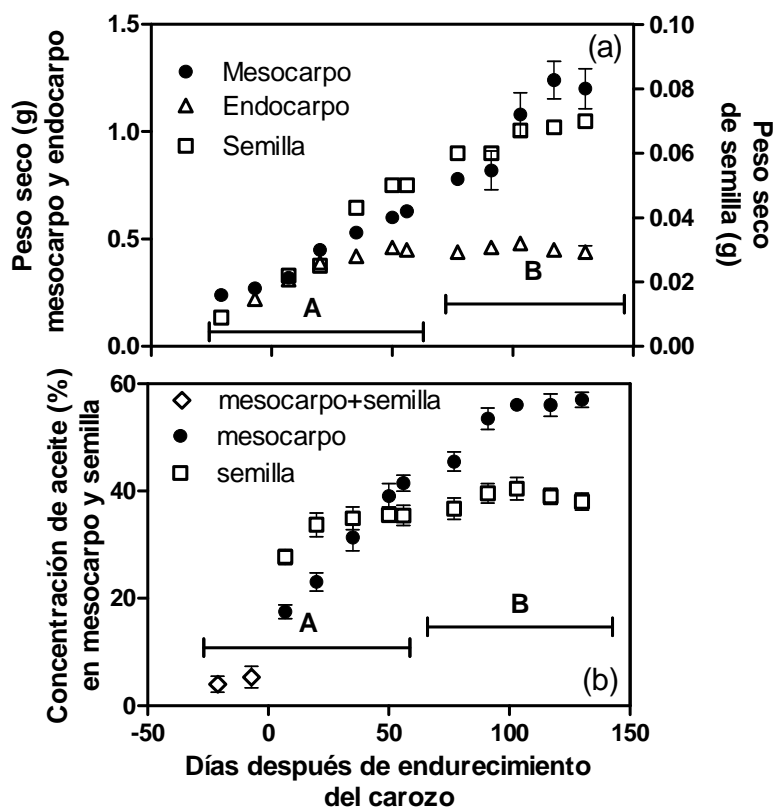


Fig. 3.3. (a) Peso seco del mesocarpo, endocarpo y semilla, (b) concentración de aceite en mesocarpo y semilla (%) en función del tiempo (días después de endurecimiento del endocarpo) en *Olea europaea* L. var. 'Arauco' (el cero corresponde a la fecha de endurecimiento del endocarpo, 30 de diciembre de 2011). Los frutos fueron cosechados de las ramas no tratados pero de características y posición similar a las tratadas. Las líneas horizontales indican los períodos de tratamiento (A: -21 a 50 días de endurecimiento del endocarpo y B: 56-130 días después del endurecimiento del endocarpo). Los símbolos representan las medias ($n = 4$) \pm un S.E y los S.E no se muestran cuando resultan más pequeños que el símbolo.

3.3.3. Peso seco y concentración de aceite en el mesocarpo y la semilla en respuesta a la temperatura.

El peso seco del mesocarpo no se modificó significativamente por los tratamientos en ninguno de los dos períodos analizados (Fig. 3.4. a y b). Ello difiere de lo encontrado al calentar ramas con frutos por períodos prolongados (4 meses) cuando se observó un efecto negativo en el peso seco del fruto con temperaturas $> 25^{\circ}\text{C}$ (Capítulo II de esta tesis). El peso seco promedio del mesocarpo al final del periodo A fue de 0.46 ± 0.03 g y 1.15 ± 0.07 g al final del Período B (datos no mostrados). La concentración de aceite en el mesocarpo se afectó negativamente por la temperatura en ambos periodos. En el periodo A la concentración de aceite disminuyó un $1.6\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ de

incremento de temperatura (Fig.3. 4. c). En el período B, considerando únicamente el aceite sintetizado durante ese período, la disminución fue de $1.8\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ B (Fig. 3.4. d).

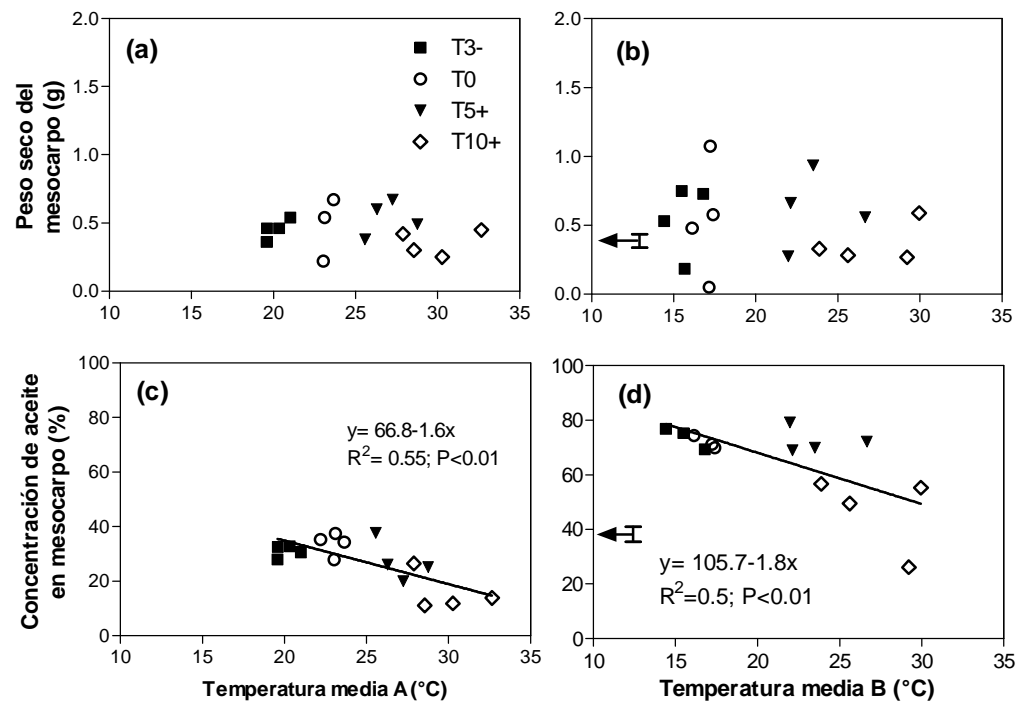


Fig. 3.4. Peso seco del mesocarp (a, b) y concentración de aceite (c, d) en el mesocarp en función de la temperatura media durante los períodos A (a, c) y B (b, d) (25 /11/ 2010 al 23 /02/ de 2011 y 1/03/2011 hasta 10/05/ 2011, respectivamente). Las variables de respuesta en el período B se estimaron sobre la biomasa y aceite acumulados durante ese período. Los tratamientos fueron: control (T0 ○), refrigeración (T3-■; 3°C menos que T0), y dos niveles de calefacción (T5+ ▼ y T10+ ◇, 5 y 10°C más que T0, respectivamente). Cada punto es el valor de una cámara con control de temperatura individual. Las flechas horizontales cruzadas por una barra vertical que apuntan al eje “y” en los paneles b y d indican los valores de peso seco y concentración de aceite promedio ± 1 S.E al inicio del período B.

El peso seco de la semilla mostró una respuesta curvilínea a la temperatura en el período A (Fig. 3. 5. a). Los pesos secos más elevados se observaron en el rango de $22-24^{\circ}\text{C}$ con una ligera caída a temperaturas más frescas, y una marcada caída a altas temperaturas. Cuando los los tratamientos de temperatura se aplicaron en un período tardío (período B), la temperatura no tuvo efecto sobre el peso seco de la semilla (Fig. 3. 5. b). La concentración de aceite en la semilla disminuyó linealmente con aumentos de temperatura en el período A, mostrando una caída de $1.2\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ (Fig. 3. 5. c). Al igual que el peso en seco de las semillas, la concentración de aceite no se vio afectada por la temperatura en el período B. Tampoco hubo diferencias entre la concentración de aceite al inicio y al final del período B (Fig. 3. 5.d).

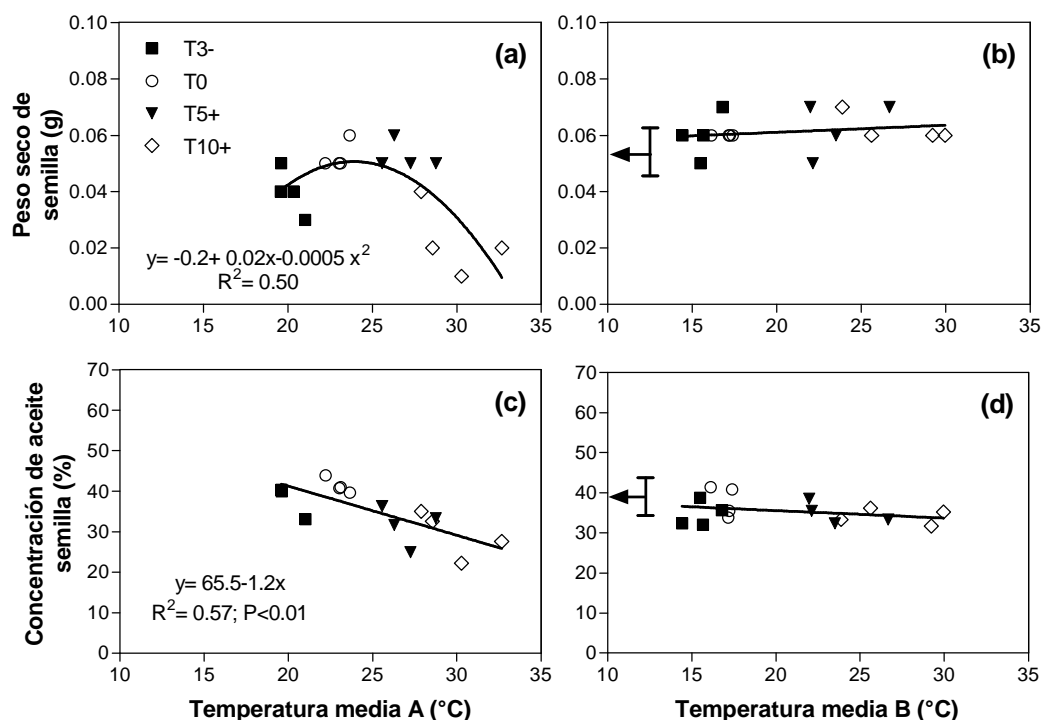


Fig. 3. 5. Peso en seco de la semillas (a, b) y concentración de aceite en la semilla (c, d) al final de cada período de tratamiento en función de la temperatura media durante el período A (a, c) y B (b, d) (25 /11/ 2010 a 23/02/2011 y 1 /03/ a 10 /05/ 2011, respectivamente). Los tratamientos fueron: control (T0 ○), refrigeración (T3-■; 3 ° C menos que T0), (T0 ●), y dos niveles de calefacción (T5 + ▼ y T10 + ◇, 5 y 10 ° C más que T0, respectivamente). Cada punto es el valor de una cámara con control de temperatura individual. Las líneas de regresión en b y d no fueron estadísticamente significativas, pero se incluyen para ilustrar la falta de respuesta. Las flechas horizontales cruzadas por una barra vertical que apuntan al eje “y” en los paneles b y d indican los valores de peso seco y concentración de aceite promedio ± 1 S.E al inicio del período B.

3.3.4. Respuestas a la temperatura del ácido oleico del aceite de mesocarpo y semilla

En el aceite de mesocarpo la concentración de ácido oleico disminuyó linealmente con el aumento de la temperatura en ambos períodos de tratamiento. En el Período A, la concentración de ácido oleico cayó un $1.4 \% ^\circ\text{C}^{-1}$ (Fig. 3.6. a), alcanzando una diferencia de 14 puntos porcentuales entre tratamientos extremos (T3- y T10 +). En el aceite sintetizado durante el período B, la concentración de ácido oleico disminuyó linealmente con la temperatura a una tasa levemente menor de $1\% ^\circ\text{C}^{-1}$ (Fig. 3. 6. b). Si bien hay una caída en la proporción de ácido oleico en el aceite en función de la temperatura desde el inicio del período B (ver flecha en Fig. 3.6. B) hasta la cosecha final, los frutos continuaron sintetizando ácido oleico en el período de tratamiento. Por ejemplo, se sintetizó $0.25 \text{ g fruto}^{-1}$ de ácido oleico en T3- mientras que sólo $0.07 \text{ g fruto}^{-1}$

¹ en T10 + (datos no mostrados). La concentración de ácido oleico en el aceite de semilla mostró una respuesta curvilínea a la temperatura en el período A, con una concentración máxima oleico de 68.7% a 28 °C seguido de una ligera disminución a temperaturas más altas (Fig. 3.6. c). Consistente con la nula acumulación de aceite registrada en la semilla durante el periodo B, la concentración de ácido oleico en aceite de semilla no se modificó con la temperatura durante dicho período (Fig. 3.6. d).

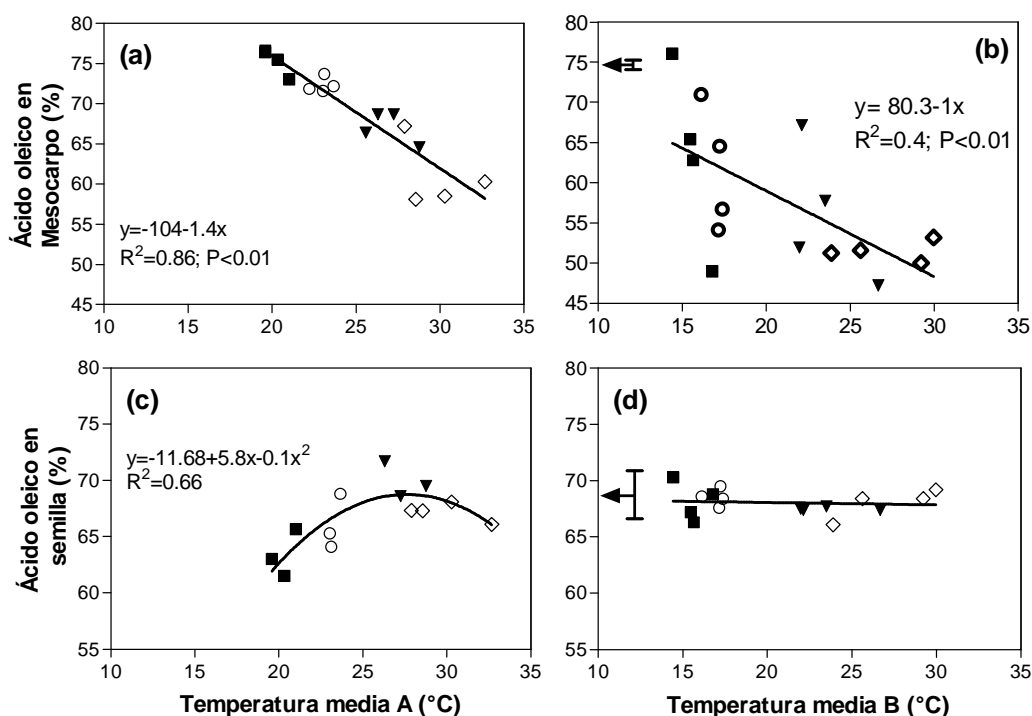


Fig. 3.6. Concentración de ácido oleico del aceite de mesocarpio (%) al final del período de tratamiento en función de la temperatura media durante cada uno de los períodos A (a) y B (b) (25/11/ 2010 a 23/02/ 2011 y el 1 /03/ al 10 /05/ 2011). Los paneles inferiores muestran la concentración de ácido oleico (%) presente en el aceite de semilla en función de la temperatura media durante el período A (c) y B (D). Los tratamientos fueron: control (T0 ○), refrigeración (T3-■; 3 ° C menos que T0), y dos niveles de calefacción (T5 + ▼ y T10 + ◇, 5 y 10 ° C más que T0, respectivamente). Cada punto es el valor correspondiente a una cámara con control individual de temperatura. La línea de regresión en d no fue estadísticamente significativa, pero se muestra para ilustrar la falta de respuesta. Las flechas horizontales cruzadas por una barra vertical que apuntan al eje “y” en los paneles b y d indican los valores de proporción de ácido oleico promedio ± 1 S.E al inicio del período B en mesocarpio y semilla respectivamente.

3.3.5. Respuesta a la temperatura de los ácidos grasos minoritarios de los aceites de semillas y mesocarpio.

El ácido oleico es el principal ácido graso presente en el aceite de oliva, pero otros ácidos grasos también están presentes en proporciones considerables. En el aceite de mesocarpio, el ácido palmítico y el ácido linoleico fueron afectados por la temperatura, aumentando linealmente 0.64% y 0.5 % °C⁻¹ de incremento de la temperatura respectivamente, durante el período A (Fig. 3.7. a). En el periodo B, los cambios provocados por la temperatura fueron de menor intensidad, aumentando 0.35% y 0.12 % °C⁻¹ (P < 0,01) el ácido palmítico y linoleico, respectivamente (Fig. 3. 7. b).

Los ácidos esteárico y linolénico hicieron contribuciones de menor importancia a la composición final del aceite de mesocarpio (<5%). El ácido linolénico mostró un incremento de $0.2\% \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ en el período A, mientras que el ácido esteárico no respondió a la temperatura dentro del rango analizado durante este período (Fig. 3.7. c). En el periodo B, el ácido linolénico aumentó con la temperatura a una tasa de $0.02\% \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$, mientras que el ácido esteárico, como en el período A, tampoco se vio afectado por la temperatura (Fig. 3.7. d).

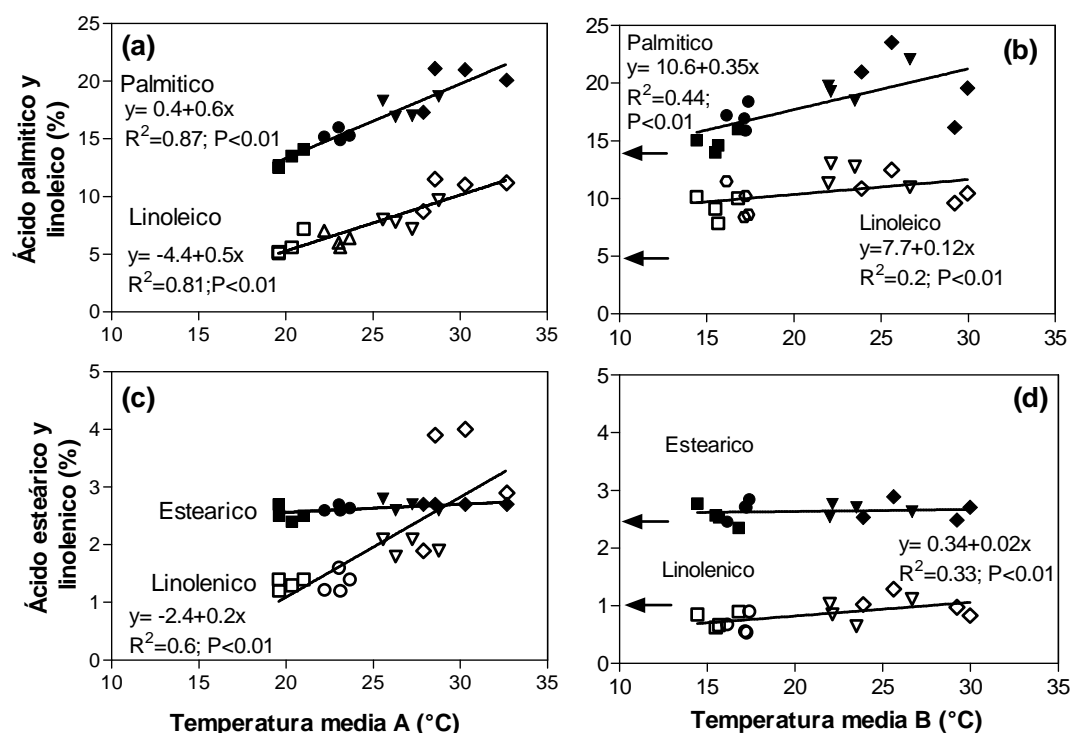


Fig. 3.7. Respuesta de los ácidos grasos minoritarios del aceite de mesocarpio en los períodos A (paneles de la izquierda) y B (paneles de la derecha) a la temperatura media del período. Los tratamientos fueron: control (T0 \circ), refrigeración (T3- \blacksquare ; 3° menos que T0), y dos niveles de calefacción (T5 + \blacktriangledown y T10 + \diamond , 5 y 10°C por arriba de T0, respectivamente). Cada punto es el valor de una cámara con temperatura controlada individualmente. Las líneas de regresión para el ácido esteárico en los paneles c y d no fueron estadísticamente significativas, pero se incluyen para ilustrar la ausencia de respuesta. Las flechas horizontales que apuntan al eje “y” en los paneles b y d indican los valores de la proporción de los ácidos grasos promedio (los valores de los S.E fueron bajos y no se pudieron graficar) al inicio del período B en mesocarpio.

En el caso de la composición de ácidos grasos de aceite de semilla, tres ácidos grasos mostraron respuestas sigmoidal a la temperatura en el periodo A. El ácido linoleico mostró altas concentraciones (entre 21% y 25%) con temperaturas por debajo de 24°C , pero disminuyó drásticamente alcanzando valores entre 1.7 y 0.3%, con temperaturas superiores a 25.5°C . Por el contrario, las concentraciones de ácido palmítico y esteárico fueron bajas (10% y 2.5%, respectivamente) cuando la

temperatura media fue $< 24\text{ }^{\circ}\text{C}$, elevándose a 22% y 6,3% con temperaturas más altas (Figs. 3.8. a y c). Finalmente, ácido linolénico disminuyó linealmente $0.03\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ (Fig. 3.8. c). En el periodo B, las concentraciones de ácido linolénico palmítico, esteárico, linoleico y no cambiaron significativamente en el aceite de semilla a pesar del amplio rango de temperaturas explorados ($15\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $30\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Figs. 3. 8. b y d).

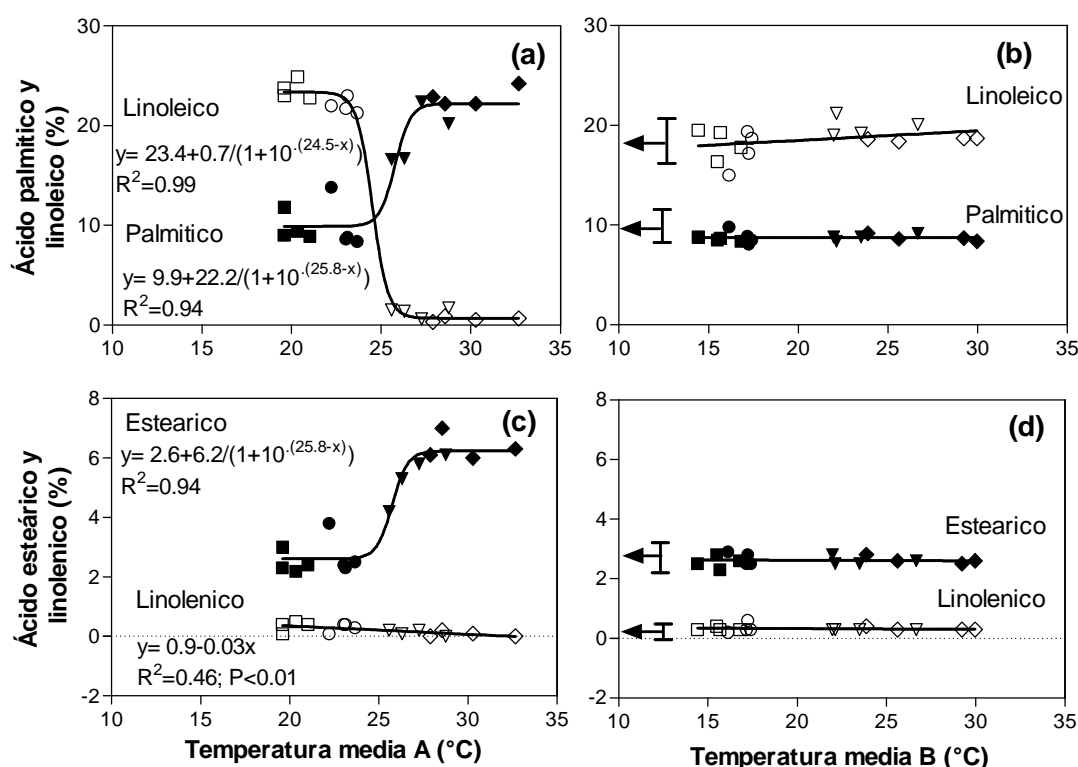


Fig. 3.8. Concentración de los ácidos grasos minoritarios presentes en semilla en función de la temperatura media en los períodos A (paneles de la izquierda) y B (paneles de la derecha). Los tratamientos fueron: control (T_0 ○), refrigeración (T_3 ■; $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ menos que T_0), y dos niveles de calefacción (T_5 + ▼ y T_{10} + ◇, 5 y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por arriba de T_0 , respectivamente). Cada punto es el valor de una cámara con temperatura controlada individualmente. Las líneas de regresión en b y d no fueron estadísticamente significativas, pero se incluyen para ilustrar la falta de respuesta. Las flechas horizontales cruzadas por una barra vertical que apuntan al eje “y” en los paneles b y d indican los valores de proporción de los ácidos grasos promedio ± 1 S.E al inicio del período B en el aceite de semilla.

3.4. Discusión

El peso seco del fruto de olivo de la var. 'Arauco' está representado en un 70% por el peso del mesocarpo, 26% por el endocarpo y 4 % por la semilla según los valores que surgieron del análisis de los frutos analizados para realizar la curva de crecimiento (Fig. 3.3). El peso seco del mesocarpo no se modificó significativamente con la temperatura en ninguno de los períodos analizados (A o B) (Fig. 3.4. a y b). Esto difiere de lo encontrado en el Capítulo II donde temperaturas $>25^{\circ}\text{C}$ provocaron caídas del peso seco del fruto entero ($0.08 \text{ g } ^{\circ}\text{C}^{-1}$). Posiblemente, la duración total de ambos períodos de tratamiento en el actual experimento (90 días en el período A y 74 días en el periodo B, por contraste con los 114 días de tratamiento en el experimento informado en el Capítulo II) no fueron suficientes para que la temperatura afectara de manera significativa el peso seco del mesocarpo. El endocarpo, la segunda estructura de mayor peso seco del fruto, tampoco se modificó con la temperatura (datos no mostrados). A diferencia del mesocarpo, el peso seco de la semilla mostró una respuesta curvilínea a la temperatura con un máximo a 26°C en el período A (Fig. 3.5. a), similar al patrón informado para el peso final de embriones de girasol donde el peso seco del embrión disminuyó con temperaturas $>25^{\circ}\text{C}$ (Chimenti et al., 2001).

La concentración de aceite mostró patrones de respuesta a la temperatura similares en ambas estructuras del fruto de olivo. En el mesocarpo la concentración de aceite disminuyó con el aumento de la temperatura en ambos períodos (A y B), cayendo a una tasa de 1.6% y $1.8\% \text{ } ^{\circ}\text{C}^{-1}$, respectivamente (Fig. 3.4. c y d). Esta respuesta es consistente con lo informado en el Cap. II para fruto entero, donde la concentración de aceite cayó $1.13\% \text{ } ^{\circ}\text{C}^{-1}$ durante el *experimento de cuatro meses de duración* (Fig. 2.4. b). La concentración de aceite en la semilla mostró un patrón similar a la del mesocarpo en el período A disminuyendo $1.2\% \text{ } ^{\circ}\text{C}^{-1}$ mientras que no se modificó durante el periodo B, habiendo alcanzado su concentración máxima antes del inicio de ese período (Fig. 3.5. c y d). Este trabajo es el primero realizado en oleaginosas que acumulan aceite principalmente en mesocarpo y en menor proporción en semilla en el que se analizan las respuestas a la temperatura de los dos órganos por separado. Este estudio permitió comparar los resultados obtenidos en semillas de olivo con lo conocido en oleaginosas de semilla como girasol.

Los resultados presentados en el capítulo anterior de esta tesis (Cap. II) referidas a fruto entero, mostraron algunos resultados opuestos a los informados hasta el momento para especies oleaginosas de semilla respecto a la respuesta de la proporción de ácidos grasos a la temperatura. Por ejemplo, el aumento de la temperatura provocó una caída en la proporción de oleico en el aceite de oliva de fruto entero, mientras que las evidencias en otras especies (girasol, soja ó maíz) muestran que a mayor temperatura, aumenta la proporción de oleico. Producto de esta observación se planteó que el comportamiento particular observado en olivo podría estar vinculado a la estructura del fruto en el que se acumula el aceite en mayor proporción (mesocarpo en

olivo, embrión en oleaginosas de semilla). Para responder este interrogante, en este capítulo, se realizó el análisis de los órganos del fruto de olivo de manera independiente. Para determinar los momentos de aplicación de los tratamientos térmicos se tuvo en cuenta la dinámica de crecimiento de los órganos del fruto de olivo. El mesocarpio y la semilla crecen asincrónicamente en la drupa, con un período de superposición parcial. En var. 'Arauco', el crecimiento de la semilla terminó antes (77 DDEE) que el mesocarpio, que continuó creciendo hasta la madurez (117 DDEE, Fig. 3.3. a). Esta dinámica diferencial de crecimiento de los órganos del fruto permitió separar el efecto de la temperatura sobre la semilla y el mesocarpio. Si bien la metodología aplicada permitió resolver interrogantes planteados sobre las observaciones en olivo y las oleaginosas de semilla, queda pendiente conocer la respuesta de la proporción de ácidos grasos en otras oleaginosas que acumulan aceite en mesocarpio como palta o palma aceitera.

La proporción de ácidos grasos en el aceite de mesocarpio y semilla de olivo de la variedad 'Arauco' tuvieron algunas diferencias. Por ejemplo, en el aceite de frutos no tratados se encontraron diferencias en la proporción de los ácidos palmítico (14% en mesocarpio, 9% en semillas), linoleico (12% en mesocarpio, 18% en semillas) y linolénico (0.9% en mesocarpio y 0.3% en semillas), pero no se registraron diferencias entre ambos tejidos en la concentración de ácido oleico. Esto difiere con lo informado por Hilditch (1964) donde se informan proporciones similares de algunos ácidos grasos entre ambas estructuras de olivo. El efecto de la temperatura sobre la concentración de ácido oleico en mesocarpio fue similar en ambos períodos de tratamiento. El período más temprano mostró mayor sensibilidad, disminuyendo $1.4 \% ^\circ\text{C}^{-1}$ de aumento de la temperatura, mientras que en el período B la caída fue de $1 \% ^\circ\text{C}^{-1}$. Esta mayor sensibilidad en momentos tempranos se evidenció cuando el mesocarpio había acumulado hasta el 47% del aceite total sintetizado en esa estructura al final de la estación. Esto es consistente con lo observado al aplicar un tratamiento de calentamiento ($6 ^\circ\text{C}$ más caliente que el control) de un mes, entre enero y febrero, en comparación con los períodos posteriores de un mes de duración (hasta mayo) (ver Cap II. 2.6. c). Además, la disminución lineal de la proporción de oleico en mesocarpio corrobora los resultados obtenidos en el Cap. II al calentar frutos durante 4 meses (Fig. 2.5. a). En correspondencia con la caída del ácido oleico en el aceite de mesocarpio, otros ácidos grasos aumentaron su proporción. La proporción de ácidos grasos durante el período temprano (A), mostró mayor sensibilidad a la temperatura que en el período B (Fig. 3.7, comparar pendientes del período A (paneles a y c) con las pendientes de período B (paneles b y d)). Como consecuencia de las tasas de cambio en la proporción de ácidos grasos en el aceite, en ambos períodos se superaron los límites propuestos por el COI para el aceite de la categoría virgen extra para el ácido palmítico y linolénico. En el caso del ácido palmítico, el límite reglamentado es de 20% y se superó con temperaturas por encima de $28 ^\circ\text{C}$ en el período A y con temperaturas $>25^\circ\text{C}$ en B. El ácido linolénico tiene un límite de 1%, que fue superado en el período A en todo el rango térmico explorado por el experimento y en B sólo en algunas muestras que tuvieron temperaturas $> 25 ^\circ\text{C}$.

La proporción de ácidos grasos del aceite de semilla también se modificó en respuesta a la temperatura, aunque sólo en el período A y de manera diferente a la observada en el aceite de mesocarpo. Vistos en su conjunto, los patrones de respuesta a la temperatura de los ácidos grasos principales (es decir, oleico, linoleico, palmítico, y esteárico, las Figs. 3.6 c, 3.8 a y c), se observa en general que una temperatura superior a 25 °C podría estar afectando la biosíntesis de ácidos grasos, a través de su efecto sobre desaturasas que intervienen en la secuencia de conversión ácido esteárico a ácido oleico, de oleico a ácido linoleico y de linoleico a ácido linolénico. Al mismo tiempo, se acumulan los precursores ácido palmítico y ácido esteárico (Fig. 3.7a y c). La respuesta a la temperatura de ácidos grasos menores observada en las semillas de olivo es novedosa y distinta a la informada para otros cultivos oleaginosos de semillas. Es destacable el hecho que el efecto de la temperatura sobre la composición acídica del aceite de la semilla de olivo no ocurrió solo sobre la relación oleico/ linoleico como ocurre principalmente en otras oleaginosas de semilla (girasol, soja o maíz) si no que se evidencia un fuerte efecto sobre los ácidos grasos saturados (especialmente palmítico, Fig. 3.8. a). Existe un antecedente donde se observó efecto de la temperatura sobre la proporción de ácidos grasos saturados en girasol. En ese caso la variación en la concentración de ácido esteárico estuvo inversamente relacionada a las variaciones de los ácidos oleico + linoleico (Izquierdo y Aguirrezábal, 2008), sugiriendo que hay un efecto de la temperatura sobre la enzima estearato desaturasa que regula el pasaje de ácido esteárico a ácido oleico (Kabbaj et al., 1996). Este antecedente es contrario a la respuesta observada en la semilla de olivo donde el aumento de la temperatura incrementó la proporción del ácido esteárico. Otros trabajos donde se midieron tanto el ácido esteárico como el palmítico no mostraron cambios significativos al aplicar tratamientos térmicos. Esto se observó tanto en estudios en los que se aumentó la temperatura día / noche (Martínez-Force et al., 1998), se aumentó la temperatura de la noche (Izquierdo et al., 2002) o se aplicó 7 días de alta temperatura entre los días 19 y 33 después de la floración (Rondanini et al., 2003).

Los ácidos oleico y linoleico en cambio mostraron un patrón de respuesta a la temperatura similar en semillas de olivo y en las de cultivos oleaginosos de semillas. Por ejemplo, en el maíz y soja se informó una relación lineal positiva entre el ácido oleico y la temperatura (Zuil et al., 2012), mientras que en girasol se propuso una respuesta bilineal (Izquierdo et al., 2006), similar a lo observado en el presente trabajo dentro del mismo rango térmico (15 - 30 ° C). Las proporciones de ácido linoleico en semillas de olivo y de girasol mostraron respuestas similares (caídas abruptas) a la temperatura. En la semilla de olivo la temperatura > 25 ° C provocó una caída de 20 puntos porcentuales en la proporción de linoleico (Fig. 3.7a); la misma respuesta se encontró en girasol tanto cuando se aplicaron temperaturas > 25 ° C 7 días de durante el crecimiento de las semillas (Rondanini et al., 2003), o al crecer las semillas a temperaturas de 30/20 ° C en comparación con 20/10 ° C (Martínez-Force et al., 1998). Hasta el momento no hay información sobre el efecto de la temperatura sobre la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en la desaturación de los ácidos grasos en semillas de olivo ó del efecto sobre la regulación de su actividad. Para

girasol, algunos estudios mostraron que la actividad oleato desaturasa es inhibida parcialmente y de forma reversible por las altas temperaturas (30 °C), provocando una reducción de la concentración de ácido linoleico en el aceite (Sarmiento et al., 1998). Esta respuesta en la proporción de ácidos grasos es consistente con nuestros hallazgos para semilla de olivo pero opuesta a la hallada para aceite de mesocarpio. Además, en girasol, se conoce que los aumentos de temperatura reducen la concentración de oxígeno en el interior de la semilla. Con niveles de oxígeno más bajos, la relación ATP / ADP (estado de energía) y la actividad de la enzima FAD disminuyen con un incremento correlativo en proporción de ácido oleico en el aceite (Rolletschek et al., 2007). Este mecanismo conocido en girasol no se ha estudiado en semillas o en mesocarpio de olivo. La información generada en olivo en relación a las enzimas desaturasas es más acotada. Se conoce que la expresión de los genes que codifican para las enzimas desaturasas, como estearato desaturasa (encargada de convertir ácido esteárico en ácido oleico (Haralampidis et al., 1998) ó oleato desaturasas vinculadas al pasaje de ácido oleico a linoleico (Banilas et al., 2005 y Hernández et al., 2009) ocurren en distintos momentos del crecimiento de la semilla y mesocarpio. Sin embargo todavía no hay información vinculada a la respuesta de la actividad enzimática a la temperatura.

En resumen, los resultados de este capítulo mostraron que las respuestas a la temperatura del mesocarpio y la semilla se diferenciaron en términos de composición de ácidos grasos y de peso seco, pero ambas estructuras respondieron de manera similar en términos de concentración de aceite. Los trabajos realizados hasta el momento habían generado datos basados en frutos enteros, variable que refleja el comportamiento del mesocarpio principalmente, enmascarando la respuesta de la semilla de olivo. Sin embargo, la semilla fue sensible a la temperatura durante el período temprano de crecimiento (período A); por el contrario, el mesocarpio respondió a la temperatura durante ambos periodos. El contraste entre las respuestas de los ácidos grasos del aceite de semilla y mesocarpio a la temperatura sugiere que existe una regulación diferencial dentro de estas dos estructuras del fruto. La respuesta observada en mesocarpio es consistente con los resultados del Cap. II, basados en aceite del fruto entero, que indicaban los efectos de la temperatura sobre la calidad del aceite mostrando que es diferente a la habitualmente reportada en cultivos oleaginosos de semilla. Por último, la semilla de olivo y la composición de ácidos grasos de los cultivos de semillas oleaginosas tuvieron respuesta similar a la temperatura para el ácido oleico y linoleico y distinto respecto al ácido palmítico y esteárico. Se necesitarán más estudios para comparar la maquinaria enzimática entre las especies y entre el mesocarpio y la semilla de olivo responsables de las diferencias halladas en este trabajo.

En el siguiente capítulo se presentarán los resultados de un experimento dirigido a estudiar el efecto de las distintas dimensiones del régimen térmico diario y, especialmente, el efecto de la temperatura nocturna, sobre variables de rendimiento y calidad del aceite del fruto entero. Los resultados obtenidos permitieron acotar las dimensiones del régimen térmico diario que están más fuertemente asociadas a cada una de las variables respuesta analizadas.

Capítulo IV

**Efecto de las distintas dimensiones del
régimen térmico sobre el peso seco,
concentración de aceite y proporción de
ácidos grasos del aceite**

Capítulo IV

Efecto de las distintas dimensiones del régimen térmico sobre el peso seco, concentración de aceite y proporción de ácidos grasos del aceite

4.1. Introducción

El aceite de oliva virgen extra está compuesto principalmente por triglicéridos, en los cuales el ácido oleico alcanza la mayor proporción (55-83%) y seguido de los ácidos linoleico (3.5-21%), palmítico (7.5-20%) y linolénico ($\leq 1\%$) (COI, 2013). La composición de ácidos grasos determina propiedades nutricionales y organolépticas del aceite de oliva. Por ejemplo, el ácido oleico ayuda a disminuir los niveles de colesterol total y la lipoproteína de baja densidad (LDL) en sangre (Stark y Madar 2002). Por su parte, los ácidos linoleico y linolénico son los sustratos de enzimas que generan compuestos volátiles responsables del aroma del aceite (Salas et al., 2000). La proporción de los ácidos grasos presentes en el aceite de oliva está sujeto a variaciones debidas al genotipo, al desarrollo ontogénico del fruto y a variables ambientales, en particular la temperatura ambiente entre floración y cosecha final (Rondanini et al., 2014). Por ejemplo, en algunas variedades como Arauco y Arbequina la proporción de ácido oleico disminuye linealmente al incrementarse el tiempo térmico durante el crecimiento de los frutos, mientras que para la variedad Coratina la proporción de oleico se mantiene constante desde floración a cosecha final. En consecuencia estos patrones se asocian con la proporción de ácidos grasos deseables, particularmente oleico, presentes en el aceite a cosecha final, siendo menor en variedades como Arbequina o Arauco y mayor en Coratina. Si bien hay variaciones en las proporciones de ácidos grasos entre genotipos, todavía no se conoce la sensibilidad de estos a la temperatura y en qué grado las variaciones observadas en la composición de ácidos grasos de los aceites a cosecha podrían explicarse por el efecto de la temperatura.

La acumulación de aceite en el fruto del olivo tiene lugar en dos órganos, el mesocarpo y la semilla. La acumulación en semilla ocurre tempranamente en la fase de crecimiento del fruto (de cuaje a poco tiempo luego del endurecimiento de endocarpo), mientras que la acumulación en mesocarpo ocurre simultáneamente con la acumulación en semilla y se extiende hasta la madurez del fruto (Cap. III, Fig.3.3.). La subfase de crecimiento del fruto posterior al endurecimiento del endocarpo hasta la madurez es el período con mayor tasa de acumulación de aceite en el mesocarpo. Estudiar el efecto de las variables ambientales durante ese período es clave para cuantificar el impacto que tienen sobre la producción de aceite de oliva, ya que el aceite acumulado en mesocarpo representa el 95% del aceite total del fruto, el 5% restante se encuentra en la semilla (Conde et al., 2008). En los capítulos anteriores de esta tesis se presentaron resultados

basados en fruto entero (Cap. II) y sobre el mesocarpo y la semilla separadamente (Cap. III).

Existen algunas evidencias de tipo correlativo acerca del efecto de la temperatura sobre la proporción de ácidos grasos. Por ejemplo, en la variedad Arbequina se encontró que la concentración de ácido oleico en el aceite tuvo una correlación lineal y negativa con la temperatura media estacional en aceites provenientes de zonas con distinta temperatura media (Rondanini et al., 2011). Experimentos en los que se manipuló la temperatura de ramas fructíferas de la variedad Arauco mostraron que el porcentaje de oleico en el aceite de fruto entero (es decir, mesocarpo más semilla) disminuyó 1 % por cada °C que aumentó la temperatura media durante el crecimiento del fruto (Cap. II, Fig. 5. a). En experimentos dirigidos a dilucidar las respuestas a la temperatura de aceites de semilla de olivo (Cap. III, Fig. 6 c) y de semillas de oleaginosas anuales (Izquierdo y Aguirrezábal 2008; Zuñil et al., 2012) se observaron respuestas similares: la concentración de oleico en el aceite aumentó con la temperatura. Por contraste, el aceite de mesocarpo de olivo mostró una disminución lineal en la concentración de oleico al aumentar la temperatura (Cap. III, Figura 6 a y b).

En la literatura disponible a la fecha, la mayor información generada sobre los cambios en la proporción de ácidos grasos en función de la temperatura proviene de oleaginosas anuales como girasol, soja, maíz. En este contexto, es importante notar que algunos trabajos en oleaginosas anuales de semilla muestran que cambios en la proporción de ácidos grasos en el aceite están más correlacionados con la temperatura mínima nocturna que con la temperatura media. Experimentos en girasol en los que se elevó (10°C) la temperatura media nocturna durante la estación de crecimiento del fruto, mostraron incrementos en la concentración de ácido oleico (27% en el control y 41% al aplicar tratamiento de aumento de la temperatura nocturna) respecto a frutos creciendo a temperatura ambiente (Izquierdo et al., 2002). En este mismo cultivo, datos generados a partir de plantas creciendo en cámaras de cultivo y datos provenientes de dos sitios distintos de régimen térmico contrastante permitieron correlacionar la concentración de oleico en el aceite con la temperatura mínima nocturna, mostrando que la concentración aumenta con un patrón sigmoidal al incrementar la temperatura mínima nocturna (TMN) experimentada entre los 100 y 300°C d⁻¹ después de floración (temperatura base 6 °C) (Izquierdo y Aguirrezábal 2008). Esto indica que para un rango de TMN y para dicha ventana ontogénica la respuesta del % oleico en aceite es lineal y positiva en girasol. En soja también se detectaron variaciones en el perfil ácido del aceite al modificar las temperaturas nocturnas durante el crecimiento de las semillas. Cuando la temperatura de la noche aumentó de 20°C a 30°C, en plantas creciendo a 30°C durante las horas de luz, el ácido oleico disminuyó de 239 a 210 mg de oleico. g de aceite⁻¹. Sin embargo, cuando la temperatura del día fue más cálida (35°C), el aumento de la temperatura nocturna (de 20°C a 30°C) elevó el contenido de este ácido graso de 281 a 343 mg de oleico. g de aceite⁻¹ (Gibson y Mullen 1996). Estos resultados sugieren respuestas a las temperaturas nocturnas más complejas en soja que girasol. Estos antecedentes permiten deducir que hay procesos metabólicos asociados a las horas de

oscuridad y a la temperatura explorada durante la noche que afectan la insaturación de los ácidos grasos variando, en consecuencia, la proporción de ácidos grasos en el aceite.

Las respuestas a la temperatura del rendimiento y la calidad del aceite de olivo son mucho menos conocidas y estudiadas que las de las especies oleaginosas anuales. En capítulos anteriores de esta tesis se presentan resultados de experimentos que han puesto de manifiesto respuestas a la temperatura del aceite de olivo proveniente de fruto entero, y de la semilla y del mesocarpo en forma separada. Dichos experimentos se enfocaron en manipulaciones de la temperatura cuyos efectos fueron expresadas en términos de temperatura media diaria. Teniendo en cuenta los antecedentes en oleaginosas anuales que sugieren que la temperatura nocturna puede jugar un papel especial en la determinación de la composición del aceite, y la total ausencia de antecedentes sobre el tema en otras especies (p.ej., palta, palma aceitera) que acumulan aceite en el mesocarpo, el objetivo de este capítulo es presentar los resultados de un experimento dirigido a cuantificar la respuesta al aumento de la temperatura nocturna durante un extenso período de la fase de acumulación de aceite en el mesocarpo sobre la composición ácida (ácido palmítico, oleico, linoleico y linolénico) del aceite de oliva.

4.2. Métodos

4.2.1. Conducción de la plantación y diseño experimental

El experimento se realizó en 2013, el sitio experimental, las características de la variedad y del olivar utilizados en el experimento se mencionan en el apartado 2.2.1 del Cap. II. Se realizó un experimento de manipulación de la temperatura a nivel de rama durante el período de la subfase IV del crecimiento del fruto, período de activa acumulación de aceite en mesocarpo. En este período cada fruto del tratamiento control (T0) acumuló 0.46 g de materia seca (35% del peso seco final del fruto, incluyendo 0.39 g de aceite (63% del contenido final de aceite). La floración se registró el 19 de octubre de 2012 y el endurecimiento de carozo ocurrió el 22 de diciembre de 2012.

El diseño experimental fue en bloques completos aleatorios con 4 repeticiones, cada árbol se consideró un bloque y cada tratamiento estuvo presente en cada bloque. En el tratamiento de calentamiento nocturno (N10+) se eliminó una repetición porque se detectó una inusual defoliación de la rama y marchitez en los frutos. Para realizar el experimento se seleccionaron ramas fructíferas externas de la copa de aproximadamente 20 cm de largo que portaran entre 5-8 frutos y se encerraron en las cámaras térmicas acrílicas que se describieron en el Cap. II. La relación hoja/ fruto (fuente/ destino) se ajustó para que fuera similar en todas las ramas tratadas, raleando hojas o frutos en función de lo necesario para lograr ese objetivo.

4.2.2. Tratamientos térmicos

La temperatura dentro de cada cámara fue manipulada con el sistema de calentamiento descrito en el Cap. II. En síntesis, las temperaturas dentro de las cámaras se controlaron con 2 centrales electrónicas (caja controladora, Cavadevices, Buenos Aires, Argentina) una que regía los tratamientos de calentamiento diurno y la otra los tratamientos nocturnos. Cada cámara registró la temperatura cada 15 minutos mediante sensores de circuito integrado modelo LM35 de National Semiconductors (Dallas, Texas, USA). La adquisición de datos se realizó con un registrador de datos CR1000, Campbell Scientific Inc. (Logan, UT, USA). La central controladora regula el pasaje de la corriente de 12v que alimenta las resistencias dentro de las cámaras que son las responsables del aumento de la temperatura. Este sistema permite generar los niveles térmicos; cada uno de los controladores se programó para que aumente 5 ó 10 °C respecto al control. Cada central controladora estuvo conectada a un reloj horario que encendía la central diurna entre las 8 y las 20h y la nocturna entre las 20 y las 8h. Los tratamientos fueron un control (T0), dos niveles de calentamiento diurno: 5°C más que T0 (D5+) y 10°C sobre T0 (D10+); y dos de calentamiento nocturno: 5°C y 10°C más que el control (N5+ y N10+). Esto permitió generar un gradiente de temperaturas diurnas y un gradiente de temperaturas nocturnas, además de mantener temperaturas medias similares entre los niveles de tratamiento (por ejemplo, entre D5+ y N5+).

4.2.3. Variables de respuesta registradas

El experimento se colocó el 7 de febrero y se retiró el 24 de abril de 2013. En las cosechas inicial (inmediatamente previo al comienzo de los tratamientos) y final se determinó el peso seco de los frutos. Las técnicas de extracción del aceite y determinación de los ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico) fueron las detalladas en el Cap. II. Las variables de respuesta se estimaron sobre la biomasa y el aceite acumulados durante el período de tratamiento, para evitar los efectos de dilución derivados del hecho de que el fruto tenía una biomasa y un contenido de aceite diferente a cero al inicio del experimento. La biomasa acumulada y aceite acumulado durante el período de tratamiento se calculó restando a los valores de peso seco y contenido de aceite a cosecha, los valores medios de frutos cosechados de la misma planta al inicio del tratamiento. El incremento de la concentración de los ácidos grasos se determinó calculando el incremento en el contenido del ácido graso (entre la cosecha y el inicio del tratamiento), luego se calculó la proporción que representa el ácido graso en el total de aceite acumulado durante el período de tratamiento. Por lo tanto, los resultados se presentan referidos a los cambios en las variables de respuesta operadas durante el período de tratamiento.

4.2.4. Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos para las variables respuesta medidas en la cosecha final se evaluó utilizando un ANOVA de efectos fijos. Las diferencias entre medias de los tratamientos se evaluaron con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Estos análisis se realizaron utilizando el software SAS v8 (SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.). Las regresiones lineales entre variables y las figuras se realizaron con software GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA, EE.UU.). Se usó análisis multivariado de correspondencia efectuado con el programa PC-ORD (Multivariate Analysis of Ecological Data. Version 6. MjM Software, Gleneden Beach, OR, EE.UU) para examinar las relaciones entre las variables respuesta de calidad de aceite (porcentaje de ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico) y dimensiones (temperatura media, temperatura mínima media, temperatura máxima media y amplitud térmica) del régimen térmico al que fueron sometidos los frutos. La amplitud térmica se calculó como el promedio de las diferencias diarias entre la temperatura máxima diaria y la mínima diaria.

4.3. Resultados

4.3.1. Temperatura durante el experimento

Los tratamientos aplicados determinaron efectos claros sobre el régimen térmico de los frutos, tal como queda reflejado en las temperaturas medias diarias durante el período experimental (Cuadro. 4.1) y la marcha de la temperatura durante las 24 h del día (Fig. 4.1). Las temperaturas medias diarias aumentaron de 22.4°C en T0 a 27.2°C en N10+, mostrando diferencias significativas entre los tratamientos extremos y entre algunas combinaciones de tratamientos, por ejemplo entre los niveles de calentamiento diario (D5+ y D10+) y entre los de calentamiento nocturno (N5+ y N10+) (Cuadro. 4.1). En las marchas de temperatura diaria el tratamiento T0 mostró las oscilaciones naturales del ambiente; los tratamientos diurnos (D) copiaron a T0 durante la noche y durante el día tuvieron temperaturas mayores, mientras que los tratamientos nocturnos copiaron el patrón de T0 durante el día y aumentaron durante la noche (Fig. 4.1). Los tratamientos nocturnos tuvieron muy poca variación entre la temperatura máxima y la mínima, y por ello las amplitudes térmicas fueron bajas en el tratamiento nocturno, por ejemplo, 8.1°C (N10+) comparado con los 19.2°C del tratamiento diurno (D10+) (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Temperatura media, temperatura máxima media, mínima media y amplitud térmica de los tratamientos aplicados entre el 7 /02/2013 y el 24 /04/ 2013. Los niveles térmicos aplicados fueron: Control (T0), dos niveles de calentamiento diurno: D5+ y D10+ (5 y 10°C más que T0, entre las 8 y las 20h) y 2 niveles de calentamiento nocturno: N5+ y N10+ (5 y 10°C más que T0, entre las 20 y 8h). Los valores representan las medias \pm 1S.E (n=4). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos térmicos ($P<0.05$).

Tratamientos térmicos	Dimensiones del régimen térmico			
	Temperatura Media (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Amplitud térmica (°C)
T0	22.4 \pm 0.6 a	29.9 \pm 0.6 ab	16.6 \pm 0.7 ab	13.3 \pm 0.7 a
D5+	24.0 \pm 0.4 b	34.1 \pm 1 bc	15.7 \pm 0.3 b	18.4 \pm 1.1 b
D10+	25.8 \pm 0.4 cd	36.2 \pm 0.5 c	16.9 \pm 0.3 a	19.2 \pm 0.2 b
N5+	25.0 \pm 0.4 bc	29.2 \pm 0.5 a	21.0 \pm 0.2 c	8.1 \pm 0.4 c
N10+	27.2 \pm 0.6 d	31.2 \pm 1.1 ab	22. 2 \pm 0.1 d	9.0 \pm 1.2 c

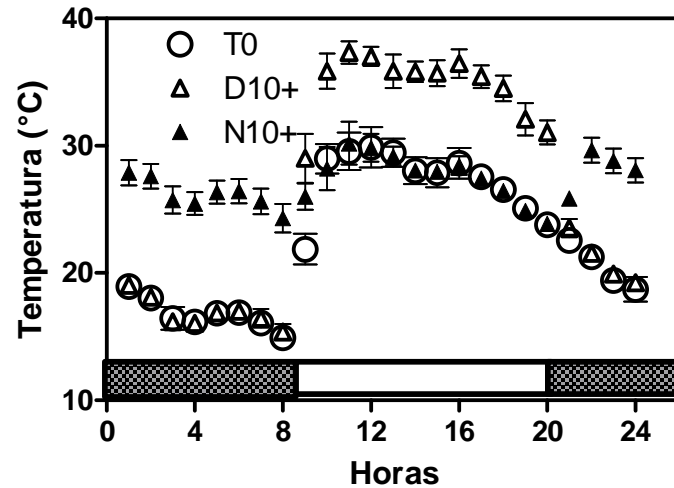


Fig.4. 1. Ejemplo de patrón térmico diario para los tratamientos: control T0 (○), calentamiento nocturno de 20-8h N10+ (▲) y calentamiento diurno de 8-20h D10+ (Δ). Los símbolos representan las medias y las líneas verticales 1 S.E. (n=4). Los valores correspondientes a los tratamientos D5+ y N5+ no se incluyeron para facilitar la lectura de la figura, pero exhibieron patrones intermedios entre los del tratamiento control y los tratamientos D10+ y N10+, respectivamente. La marcha térmica graficada corresponde al 20 de febrero de 2013.

4.3.2. Proporciones de biomasa y aceite por fruto acumulados durante el período de tratamiento.

Durante el período experimental (7 de febrero – 24 de abril de 2013), los frutos continuaron creciendo y acumulando aceite, alcanzando distintos valores finales según los tratamientos (Cuadro 4.1). En todos los tratamientos, se acumularon proporciones importantes (menores en el caso N+10) del peso seco del fruto y del aceite por fruto durante el período de tratamiento (Tabla 4.2).

Cuadro 4.2. Peso seco de los frutos y su contenido de aceite a cosecha final (24 de abril de 2013) (los valores son medias \pm 1 S.E) y contribución (%) al valor final de la biomasa y el aceite acumulado durante el período de tratamiento. Las letras diferentes en las columnas “peso seco del fruto” y “contenido de aceite” indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Tratamiento	Peso seco del fruto (g fruto ⁻¹)	Contenido de aceite (g fruto ⁻¹)	% del peso seco final acumulado ^a	% del aceite final acumulado ^b
T0	1.63 \pm 0.07 a	0.62 \pm 0.04 a	28.0	62.7
D5+	1.56 \pm 0.08 a	0.53 \pm 0.04 bc	25.0	55.7
N5+	1.66 \pm 0.06 a	0.67 \pm 0.04 a	29.0	65.0
D10+	1.62 \pm 0.04 a	0.55 \pm 0.01 bc	27.5	57.9
N10+	1.38 \pm 0.02 b	0.43 \pm 0.01 d	16.5	47.7

^a Porcentaje del peso seco final del fruto que se acumuló durante el período de tratamiento.

^b Porcentaje del contenido final de aceite por fruto que se acumuló durante el período de tratamiento

4.3.3. Respuesta del peso seco del fruto, su contenido de aceite y la concentración de aceite a los tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos aplicados generaron variaciones, entre tratamientos, en temperaturas medias, y temperaturas mínimas y máximas medias (Cuadro 4.1). A su vez la diferencia entre la temperatura máxima y mínima diaria también se modificó como consecuencia de los tratamientos (Fig. 4.1). El hecho de que el incremento en la concentración de aceite durante el período de tratamiento depende de la interacción entre los incrementos de biomasa y aceite en el fruto, impidió el uso de técnicas multivariadas para explorar las relaciones entre estas tres variables de respuesta y las dimensiones motrices candidatas del régimen térmico (temperaturas máxima, mínima, media y amplitud térmica). Por ello, se optó por usar regresiones simples entre variables de respuesta y dimensiones motrices candidatas del régimen térmico para efectuar dicha exploración. La matriz resultante se expone en la Cuadro 4.3.

Cuadro 4.3. Coeficientes de determinación y niveles de significancia de las regresiones simples entre variables de respuesta y dimensiones motrices candidatas del régimen térmico (medias diarias para el período de tratamiento).

Variable respuesta	Dimensión motriz		Valor P
	candidata	R ²	
Incremento peso seco del fruto (g)	Temperatura media	0.15	0.09
	Temperatura mínima	0.09	0.2
	Temperatura máxima	0.0004	0.93
	Amplitud térmica	0.03	0.46
Incremento contenido de aceite (g fruto ⁻¹)	Temperatura media	0.17	0.07
	Temperatura máxima	0.07	0.25
	Temperatura mínima	0.008	0.71
	Amplitud térmica	0.01	0.61
Incremento concentración de aceite (%)	Temperatura media	0.007	<0.7
	Temperatura mínima	0.47	<0.01
	Temperatura máxima	0.56	<0.01
	Amplitud térmica	0.69	<0.01

Tanto el incremento de peso seco del fruto como el incremento en contenido de aceite mostraron una relación débil, estadísticamente no significativa ($P < 0.05$), con la temperatura media (Cuadro 4.3 y Fig. 4.2). Las relaciones de estas dos variables de respuesta a las otras dimensiones motrices candidatas fueron sustancialmente más débiles que con la temperatura media. Es importante notar que aunque las relaciones de estas dos variables de respuesta con la temperatura media fueron débiles (Fig. 4.2), en ambos casos hubo una disminución importante entre extremos de la función ajustada sobre el rango de 21.7°C y 28 °C. Así, sobre ese rango, la caída en incremento de peso seco fue de 0.17 g fruto⁻¹ (equivalente a 36 % del incremento promedio de los frutos control), y la caída en el incremento de contenido de aceite por fruto fue de 0.14 g fruto⁻¹ (equivalente a 36% % del incremento promedio de los frutos control). Comparando los pesos secos promedio de los frutos que estuvieron bajo tratamientos con temperaturas medias contrastantes (la temperatura promedio de T0 fue 22.4 °C y en N10+ fue 27.2 °C) el incremento del peso seco de los frutos del tratamiento T0 fue de 0.46 ± 0.07 g fruto⁻¹ y 0.20 ± 0.02 g fruto⁻¹ en N10+, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$; datos no mostrados). En cuanto al contenido de aceite por fruto para los mismos tratamientos, el incremento de 0.39 ± 0.04 g aceite fruto⁻¹ en el tratamiento T0 se redujo a 0.19 ± 0.01 g aceite fruto⁻¹ en el tratamiento N10+. Nuevamente, estas diferencias entre tratamientos extremos fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$, datos no mostrados). Es también importante

remarcar que dentro del rango de temperaturas estudiadas, la disminución en el incremento del peso seco del fruto fue más marcada que la disminución del contenido de aceite, determinando que tanto el incremento en aceite del fruto como la proporción del incremento del peso seco del fruto (para las regresiones ajustadas) aumentó entre extremos de temperatura.

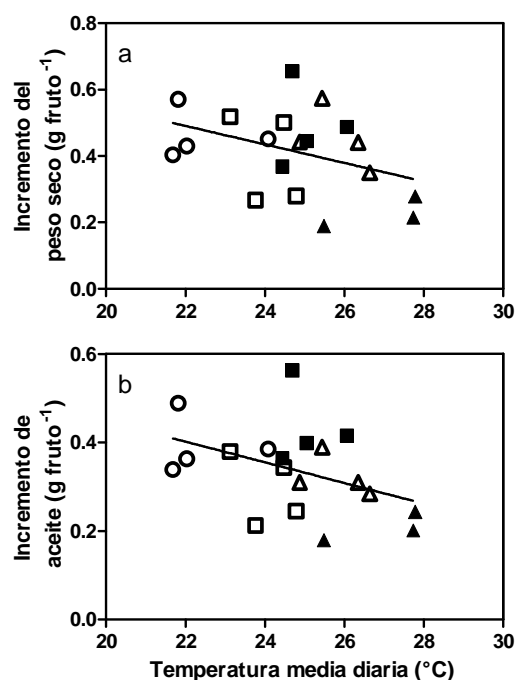


Fig.4.2. Incremento de peso seco del fruto (a) y de contenido de aceite del fruto (b) durante el periodo de tratamiento (7 /02/2013 al 24 /04/ 2013) en función de la temperatura media diaria durante el período experimental. Los tratamientos fueron: control (T0 ○), dos niveles de calentamiento diurno: D5+ (□) y D10+ (△), dos niveles de calentamiento nocturno: N5+ (■) y N10+ (▲). Cada punto representa el valor para una cámara de temperatura individualmente controlada.

Por contraste con lo ocurrido para las relaciones entre incrementos de peso del fruto y de contenido de aceite con las dimensiones motrices candidatas del régimen térmico, las relaciones entre el incremento de la concentración de aceite en el fruto con la temperatura mínima y máxima y con la amplitud térmica fueron mucho más robustas y estadísticamente significativas (Cuadro 4.3, y Figs.4.3. a, b y c). El incremento en la concentración de aceite en el fruto aumentó $2.3 \% ^\circ\text{C}^{-1}$ al incrementarse la temperatura mínima (Fig. 4.3. a). La misma tasa pero con signo opuesto ($-2.3 \% ^\circ\text{C}^{-1}$) se encontró al analizar el aumento en el porcentaje de aceite en función de la temperatura máxima media (Fig. 4.3. b). Por último, el incremento en el porcentaje de aceite disminuyó lineal y significativamente al aumentar la amplitud térmica (Fig. 4.3. c). La amplitud

térmica explicó el 70% de la variación de la proporción de aceite, mientras que la temperatura máxima explicó el 56% y la mínima el 45%. En líneas generales, los tratamientos de calentamiento nocturno N5+ y N10+ tuvieron una alta concentración de aceite, reflejando el hecho que el incremento del peso seco del fruto en estos tratamientos fue casi en su totalidad (89.8% y 91.8% respectivamente) explicado por el aumento en el contenido de aceite. Es importante también notar que esta predominancia del componente aceite en el incremento de peso seco del fruto durante el período de tratamiento está asociado con el mayor efecto relativo de las mayores temperaturas medias diarias sobre el incremento en peso seco del fruto frente al incremento de peso seco de aceite en el fruto, tal lo ya comentado para la Fig. 4.2.

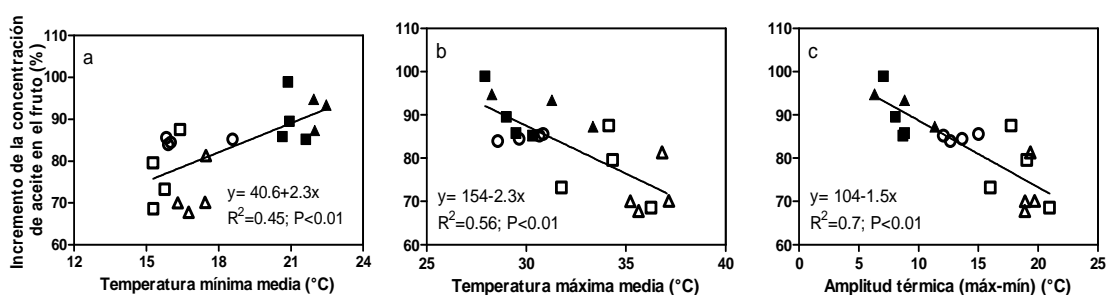


Fig.4.3. Concentración de aceite en el fruto en función de la temperatura mínima media (a), de la máxima media (b) y de la amplitud térmica (diferencia entre la temperatura máxima y mínima diaria) (c) durante el período experimental. La concentración de aceite se calculó sobre los incrementos en peso seco y aceite durante el periodo de tratamiento (de 7 de febrero al 24 de abril de 2013). Los tratamientos fueron: control T0 (○), dos niveles de calentamiento diurno: D5+ (□) y D10+ (△), dos niveles de calentamiento nocturno: N5+ (■) y N10+ (▲). Cada punto representa el valor para una cámara de temperatura individualmente controlada.

4.3.4. Variación en la proporción de los principales ácidos grasos del aceite en respuesta a los tratamientos térmicos diurnos y nocturnos

Para explorar las relaciones entre las proporciones de los principales ácidos grasos y los tratamientos aplicados se realizó un análisis de correspondencia entre dichas proporciones y las dimensiones motrices candidatas de los regímenes térmicos (Fig.4.4). Esta técnica permitió reducir las dimensiones del análisis y analizar todos los datos en un mismo espacio (Kenkel et al., 2002). De dicho análisis se desprende una fuerte asociación entre las proporciones de ácidos grasos y las dimensiones motrices candidatas: temperatura mínima, temperatura media y amplitud térmica. Los ácidos grasos insaturados (oleico, linolénico y linoleico) tuvieron mayor aporte al eje 1 que

explicó el 60.7% de la variabilidad total. El ácido oleico y el linolénico resultaron contrastantes; mientras el ácido linolénico tuvo valor positivo sobre el eje 1, el oleico tuvo valor negativo. Los ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) estuvieron más relacionados al eje 2 que explicó el 26.4 % de la variabilidad. En este análisis, las motrices predictoras que más se asociaron al Eje 1 fueron la temperatura mínima ($r=0.64$), seguida por la temperatura media ($r=0.56$) y la amplitud térmica ($r=0.44$), mientras que la temperatura máxima tuvo muy baja correlación ($r=0.16$). Respecto al eje 2, las variables predictoras que estuvieron más relacionadas fueron la amplitud térmica ($r=0.23$), la temperatura máxima ($r=0.21$), la temperatura mínima (-0.19) y una débil relación con la temperatura media ($r=-0.025$).

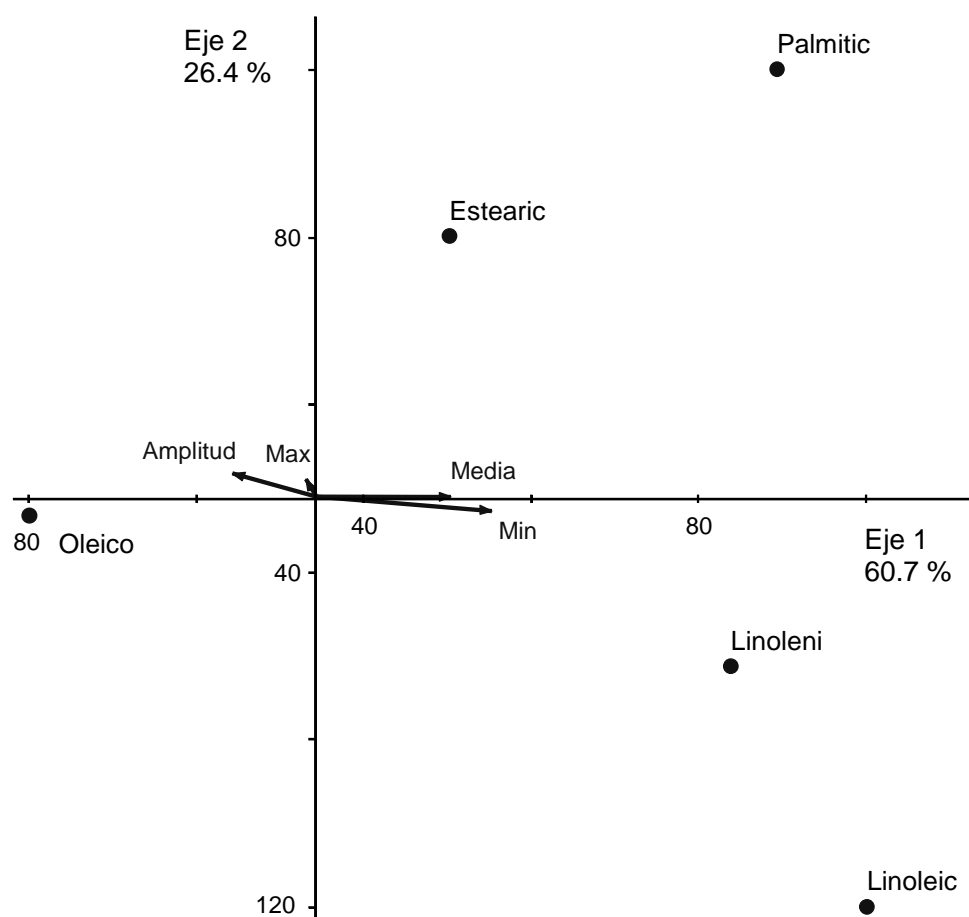


Fig.4.4. Análisis de correspondencia de los principales ácidos grasos del aceite de oliva. El 87% de la variabilidad de la proporción de los ácidos grasos es explicada por los ejes (60.7% eje 1 y 26.4% el eje 2). Los vectores muestran las relaciones entre las variables motrices predictoras (temperatura media, máxima, mínima y amplitud térmica) en el biplot generado y los puntos las posiciones de las proporciones de ácidos grasos en el mismo espacio.

Los patrones visibles en la Fig. 4.4. entre las variables motrices predictoras y la variabilidad en las proporciones de los ácidos grasos en el aceite determinaron que las relaciones variable de respuesta/variables predictoras que se analizan en lo que resta de esta sección se limiten a los efectos de la temperatura mínima, la temperatura media y la amplitud térmica.

4.3.5. Relaciones proporciones de ácidos grasos /Temperatura mínima media

Las regresiones simples entre la temperatura mínima y la proporción de ácidos grasos mostraron relaciones robustas entre variaciones en las proporciones de los ácidos oleico y linoleico con la temperatura mínima media. (Fig. 4.5. c y d). El ácido oleico disminuyó un $1.3\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ al aumentar la temperatura mínima, mientras que el linoleico aumentó $0.7\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ (Fig. 4.5. c y d respectivamente). Por el contrario, las proporciones de los ácidos palmítico y linolénico no variaron significativamente con el aumento de la temperatura mínima, mientras que la proporción de ácido esteárico se mantuvo estable ante los cambios térmicos (Fig. 4.5. a, b y e).

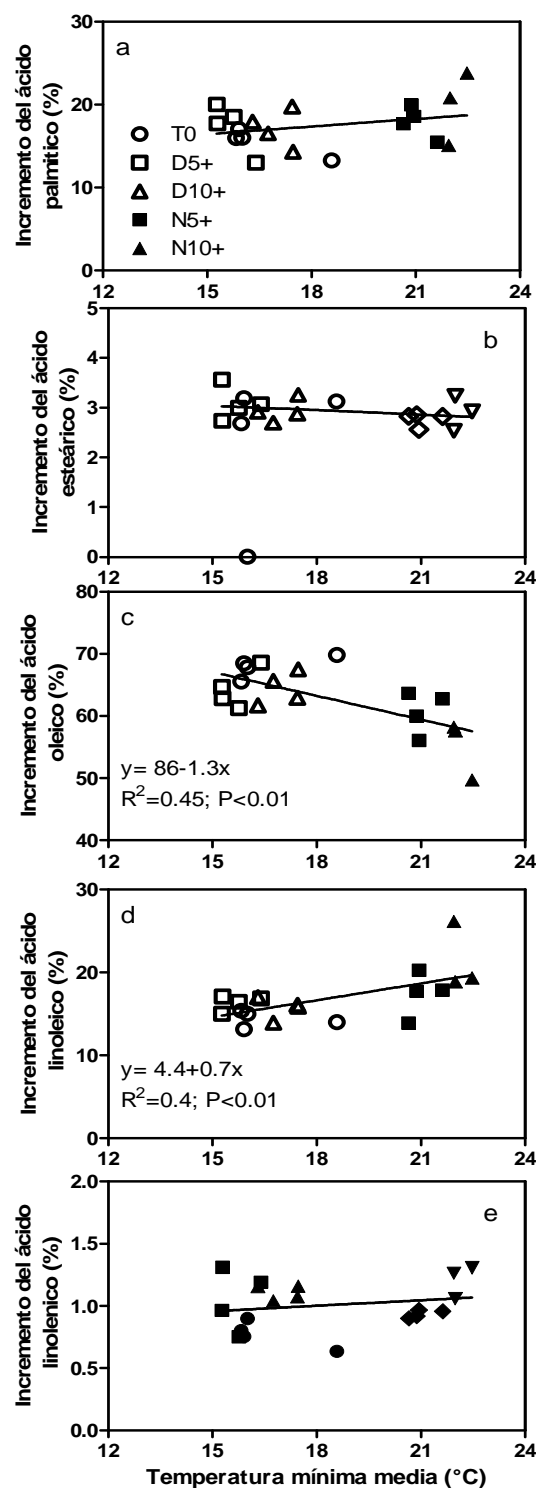


Fig.4.5. Variación en la proporción de ácido palmítico (a), esteárico (b), oleico (c), linoleico (d) y linolénico (e) en función de la temperatura mínima media durante el período de tratamiento. Los porcentajes fueron calculados sobre la base del aceite sintetizado durante el período de tratamiento. Los tratamientos fueron: T0 (○), dos niveles de calentamiento diurno: D5+ (□) y D10+ (△), dos niveles de calentamiento nocturno: N5+ (■) y N10+ (▲). Cada punto representa el valor para una cámara de temperatura individualmente controlada.

4.3.6. Relaciones proporciones de ácidos grasos /Temperatura media

Las proporciones de los ácidos grasos oleico y linoleico se asociaron significativamente con la temperatura media (Fig. 4.6. c y d), pero estas asociaciones fueron más débiles ($<R^2$) que las registradas con la temperatura mínima (Fig. 4.5. c y d). El ácido oleico disminuyó $1.6\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ (Fig. 4.6. c), una tasa algo mayor que la registrada en el aceite de mesocarpio en el período B del Capítulo III (Fig. 3.6. b) donde la caída fue de $1\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$. En tanto el ácido linoleico aumentó $0.7\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$, patrón consistente con el reportado para un período similar pero contemplando sólo el aceite de mesocarpio (Cap. III, Fig. 3. 7. b). La asociación entre la temperatura media y el ácido linolénico fue significativa (Fig. 4.6. d), contrariamente a lo ocurrido con la temperatura mínima (Fig. 4.5. e). El ácido linolénico aumentó $0.07\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ con el incremento de la temperatura media (Fig. 4.6 e); esta tasa es mayor a la encontrada al contemplar sólo el aceite acumulado en mesocarpio ($0.02\% \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$). Al igual que lo visto para la temperatura mínima media, la proporción de ácido palmítico tuvo tendencia a aumentar con la temperatura mientras que la proporción de esteárico no cambió con el aumento en la temperatura media (Fig. 4.6. a y b).

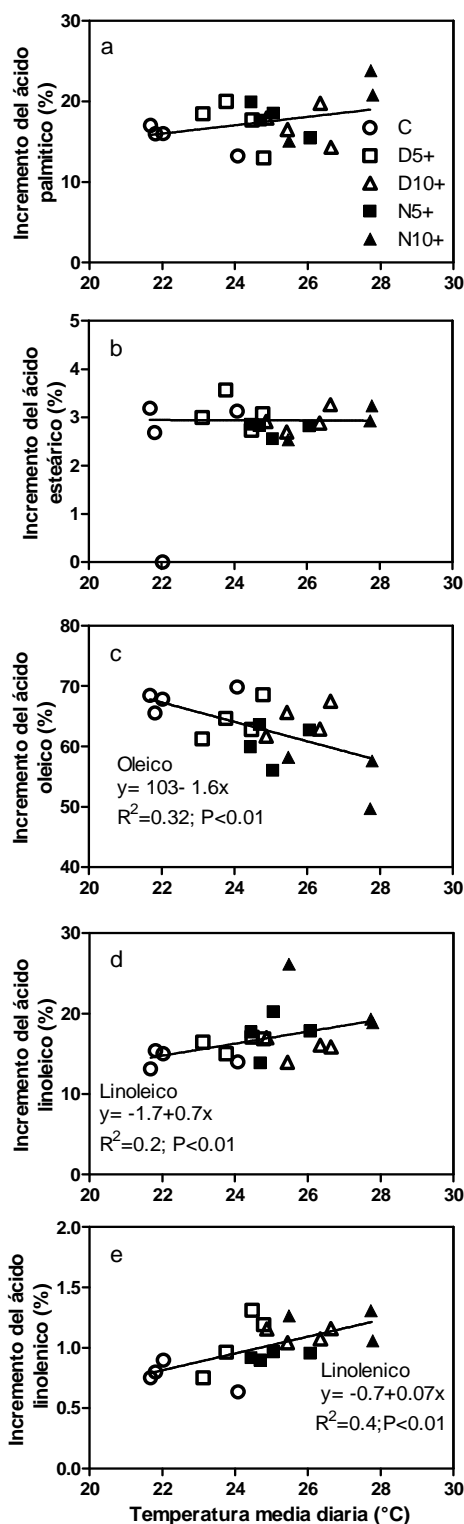


Fig. 4.6. Variación en la proporción de ácido palmítico (a), esteárico (b), oleico (c), linoleico (d), y linolénico (e) en función de la temperatura media durante el período de tratamiento. Los porcentajes fueron calculados sobre la base del aceite sintetizado durante el período de tratamiento. Los tratamientos fueron: T0 (○), dos niveles de calentamiento diurno: D5+ (□) y D10+ (△), dos niveles de calentamiento nocturno: N5+ (■) y N10+ (▲). Cada punto representa el valor para una cámara de temperatura individualmente controlada.

4.3.7. Relaciones proporciones de ácidos grasos /Amplitud térmica

La amplitud térmica mostró ser una buena variable predictora de los cambios en la proporción de los ácidos oleico, linoleico y linolénico (Fig. 4.7 c, d y e). Comparando los grados de asociación entre las dimensiones de las motrices candidatas y los ácidos oleico y linoleico se observa que para el ácido oleico es la variación en la temperatura mínima la que mejor explica la variación de este ácido graso ($R^2=0.45$), seguido por la amplitud térmica ($R^2=0.36$) y por último la temperatura media ($R^2=0.32$). La amplitud térmica, en tanto, es la que mejor explica la variación del ácido linoleico ($R^2=0.51$) y del ácido linolénico ($R^2=0.48$). Las variaciones en la concentración del ácido linoleico también fueron explicadas por la temperatura mínima ($R^2=0.4$) y en menor grado la temperatura media ($R^2=0.2$). A diferencia de las funciones ajustadas entre variables de respuesta y las temperaturas mínima y media, para las que las funciones lineales fueron las más apropiadas, en el caso de la amplitud térmica las funciones de ajuste más apropiadas fueron funciones cuadráticas. El ácido oleico aumentó con el aumento de la amplitud térmica en el rango 8 °C -17 °C, mientras que amplitudes más elevadas resultaron en una disminución en la proporción del mismo (Fig. 4.7. c). Los ácidos grasos linoleico y linolénico mostraron una respuesta opuesta (Fig. 4.7. d y e). Al aumentar la amplitud entre 8 °C y 14°C, la proporción de los ácidos linoleico y linolénico disminuyó y se incrementó a amplitudes mayores. Al igual que lo informado para las relaciones entre proporciones de ácidos grasos y la temperatura media (Fig. 4.5.). Las proporciones de los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico, no variaron significativamente con los cambios en la amplitud térmica (Fig. 4.7. a, b).

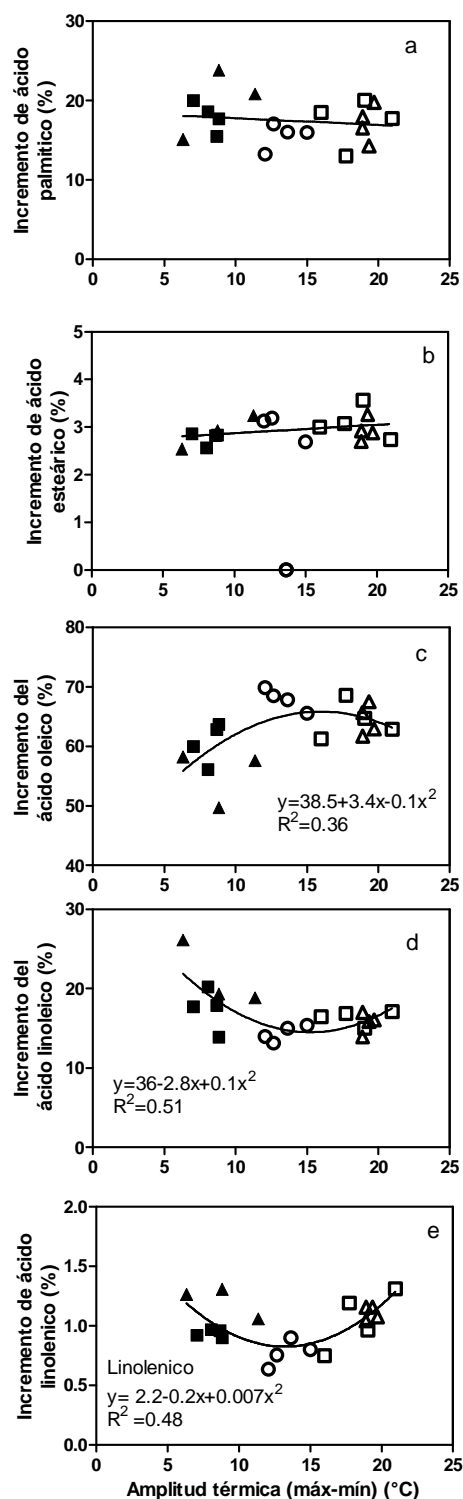


Fig. 4.7. Variación en la proporción de ácido palmítico (a), esteárico (b), oleico (c), linoleico (d) y linolénico (e) en función de la amplitud térmica durante el período de tratamiento. Los porcentajes fueron calculados sobre la base del aceite sintetizado durante el período de tratamiento. Los tratamientos fueron: control T0 (○), dos niveles de calentamiento diurno: D5+ (□) y D10+ (Δ), dos niveles de calentamiento nocturno: N5+ (■) y N10+ (▲). Cada punto representa el valor para una cámara de temperatura individualmente controlada.

4.4. Discusión

Durante el período de aplicación de los tratamientos en este experimento (subfase IV del crecimiento del fruto), se acumuló el 28% del peso seco final del fruto y el 62.7% del aceite final en el fruto (Cuadro 4.2) en el tratamiento control. Estos cambios se asociaron, en su totalidad, con el crecimiento del mesocarpo, ya que la semilla había finalizado su crecimiento previamente. El hecho que durante el período de tratamiento se hayan acumulado proporciones importantes del peso seco y aceite del fruto (menores en los calentados a lo observado en el control) refuerza los resultados obtenidos anteriormente.

Los tratamientos impuestos lograron cambios importantes en las marchas diarias de la temperatura. Por ejemplo, en el tratamiento N10+ hubo muy poca diferencia entre las temperaturas diurnas y las nocturnas, mientras que D10+ acentuó la oscilación térmica diaria (Fig. 4.1.). Estas diferencias térmicas fueron consistentes entre tratamientos, encontrando diferencias significativas entre las temperaturas medias de los tratamientos aplicados (Cuadro 4.1.). Es importante notar también el papel de la variación estacional de la temperatura del tratamiento control (datos no mostrados, pero ver Fig. 3.1. del Cap. III), ya que las marchas estacionales de la temperatura de los otros tratamientos fueron referenciadas a la del tratamiento control. En este sentido, los tratamientos aplicados modificaron el régimen térmico de los frutos pero preservaron el patrón de cambio estacional de la temperatura, imponiendo al mismo variaciones en el régimen térmico diario propios de cada tratamiento. Los rangos de temperatura generados por los tratamientos térmicos incluyeron los rangos térmicos registrados para las zonas productivas de La Rioja (La Rioja, Chilecito y Aimogasta). Por ejemplo, comparando los registros térmicos para los mismos períodos del experimento en La Rioja (entre 2009 y 2012), Aimogasta y Chilecito (2007 y 2008) el rango de temperaturas medias fue de 23 – 23.8 °C, la temperatura máxima 30.1 – 31 °C, la mínima 15.8- 16.8 °C y la amplitud 13.3-14.9 °C. El hecho de explorar rangos mayores de temperatura en el experimento permitió describir la respuesta a la temperatura y permitirá extrapolar la información generada a otras regiones productivas.

El peso seco del fruto y la concentración de aceite son componentes relevantes en la definición del rendimiento del olivo. El peso seco mostró una tendencia a disminuir con el aumento de la temperatura media (Fig. 4.2. a), con diferencias significativas entre los extremos de las funciones ajustadas. Una tendencia similar se observó en el peso seco del mesocarpo al comparar tratamientos térmicos extremos cuando los tratamientos se aplicaron entre marzo y mayo (abarcando un período algo más tardío) en el Cap. III (Fig. 3.4. b). En cambio, las tendencias en los cambios de la proporción de aceite con la temperatura media no fueron consistentes entre los resultados de este capítulo y los del período B del Cap. III. Mientras que en el Cap. III la concentración de aceite fue explicada por la temperatura media (Fig. 3.4 d), los datos

obtenidos en el presente capítulo no mostraron dicha relación, posiblemente debido a que el rango térmico explorado fue más estrecho (15.6°C - 27.2°C en el Cap. III vs. 21.6°C - 27.8° en el Cap. IV). Sin embargo, la proporción de aceite en el fruto estuvo asociada a las otras variables motrices candidatas (temperatura mínima, máxima media y amplitud térmica) analizados en este experimento (Fig. 4.3.).

Respecto a la proporción de los ácidos grasos, los resultados del presente experimento fueron consistentes con los obtenidos para el aceite de mesocarpo en el Cap. III durante el período B (tratamiento térmico aplicado entre marzo y mayo, período similar al de este experimento aunque algo corrido en el tiempo). En ambos años las proporciones de ácidos grasos exhibieron tendencias similares frente a variaciones en la temperatura media, a pesar del estrecho rango de temperaturas medias explorado en este capítulo comparado con el capítulo III. En ambos experimentos el ácido oleico disminuyó con el aumento de la temperatura media (comparar Fig. 3.6. b y 4.7. c). En el mismo sentido, los ácidos linoleico, palmítico y linolénico incrementaron su proporción al aumentar la temperatura media en ambos experimentos (comparar Fig. 3.7. b y d con Fig. 4.6. a, d y e), mientras que la proporción de ácido esteárico fue estable a los cambios en la temperatura (Fig. 3.7. d y 4.6. b).

La convergencia general entre los elementos comparables de los resultados de este ensayo y los de la porción del ensayo descrito para el período B en el Cap. III que se señala en los dos párrafos precedentes refuerzan la hipótesis que los elementos distintivos de las respuestas a las condiciones térmicas aplicadas halladas en el ensayo descrito en el presente capítulo tienen un sólido fundamento. En relación con el objetivo primordial de este ensayo, el cual consistió en explorar los efectos del aumento de la temperatura nocturna sobre la composición acídica del aceite, los resultados –sin ser totalmente concluyentes– permiten afirmar lo siguiente:

- Los ácidos grasos en el aceite que mostraron ser más sensibles a dimensiones particulares de la temperatura diaria fueron oleico y linoleico, y en menor grado el ácido linolénico (Fig. 4.5. c, d, Fig. 4.6. c, d, e y Fig. 4.7. c, d, e). Las proporciones de los otros ácidos grasos determinados en este ensayo (palmítico y esteárico) no mostraron cambios sustanciales. (Fig. 4.5. a, b; Fig. 4.6. a, b y Fig. 4.7. a, b)
- Las variables motrices candidatas de mayor valor predictivo en relación con las proporciones de oleico y linoleico fueron la temperatura mínima media y la amplitud térmica, seguidos de la temperatura media diaria (Fig. 4.5. c y d, Fig. 4.6. c, d y Fig. 4.6. c, d). Una excepción a este patrón fue el ácido linolénico, que no mostró asociación con la mínima media, pero sí lo hizo con la temperatura media diaria y la amplitud térmica (Fig. 4.6. e y Fig. 4.7. e).

De lo expuesto anteriormente surge que la temperatura mínima y/o la amplitud térmica diaria (variables que tienden a co-variar) tuvieron impactos importantes sobre las proporciones de los ácidos oleico y linoleico en el aceite, mientras que la concentración del ácido linolénico estuvo asociado sólo con la amplitud térmica. En

contraposición, los ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) no variaron su proporción con los cambios en la temperatura. Esta información dejaría en evidencia la mayor sensibilidad de la vía de síntesis de los ácidos grasos insaturados a la temperatura mínima y amplitud térmica. Respecto a la temperatura mínima, variable que mejor explicó los cambios en la proporción del ácido oleico, esta asociación coincide con lo informado para la oleaginosa anual girasol (Izquierdo y Aguirrezábal 2008). El contraste entre estas dos especies fue que la proporción de oleico en el aceite de girasol aumentó con el aumento de la temperatura mínima, mientras que en olivo la proporción disminuye. Existen antecedentes de trabajos, a nivel molecular, donde se estudiaron los cambios en el nivel de expresión de los genes que codifican para las enzimas oleato desaturasa (involucradas en el pasaje de oleico a linoleico). Hernández et al. (2011), realizaron una secuencia de experimentos para observar los cambios en la expresión de estos genes bajo distintas condiciones ambientales. En este estudio se observó que la expresión de genes que codifica para las enzimas oleato desaturasas disminuye al exponer ramas fructíferas, en condiciones de oscuridad y durante 24 h, a condiciones de altas temperaturas (v.gr., pasar de 25°C a 35°C) por el mismo período de tiempo (Hernández et al., 2011). Estos resultados a nivel molecular no son consistentes con las respuestas observadas en el presente experimento realizado a campo y sobre un largo período donde las temperaturas mínimas (asociadas a las horas de oscuridad) provocaron aumentos en la proporción de ácido linoleico. Futuros estudios a nivel de expresión de genes que consideren simultáneamente las variaciones luz/oscuridad y la temperatura por períodos más prolongados serán necesarios para entender los mecanismos enzimáticos que explican estos patrones de cambio en la proporción de ácidos grasos.

Este es el primer trabajo que explora los efectos de la temperatura mínima en oleaginosas que acumulan aceite principalmente en mesocarpo, y es uno de los primeros que propone a la amplitud térmica como motriz candidata a explicar los cambios en la proporción de ácidos grasos del aceite. En otros frutales como vid, un estudio manipulativo de la amplitud térmica produjo variaciones en la composición de proantocianidinas, compuestos que contribuyen a la calidad del vino. Por ejemplo la disminución de la amplitud térmica durante el crecimiento del fruto redujo el grado de polimerización de las proantocianidinas presentes en la piel de la uva (Cohen et al., 2008). Si bien las rutas metabólicas implicadas en la insaturación de los ácidos grasos en olivo y la de polimerización de proantocianidinas en vid son distintas, es valioso resaltar que en ambos casos se registraron cambios que variaron con la amplitud térmica. En olivo, y en el presente experimento las proporciones de oleico, linoleico y linolénico estuvieron asociadas a variaciones en la amplitud térmica. Como se mencionó anteriormente, la amplitud térmica co-varía con la temperatura mínima (motriz candidata que tuvo mayor asociación con los cambios en la proporción de oleico). Para probar cuál de las motrices candidatas (temperatura mínima o la amplitud térmica) es la que mejor explica los cambios en la proporción de ácidos grasos será necesario realizar un experimento que mantenga constante la amplitud térmica y varíe la temperatura mínima. Esto permitirá independizar a cada variable predictora y evaluar el impacto

sobre los cambios en la proporción de los ácidos grasos. Este paso permitirá seleccionar la variable de mejor ajuste para incorporar en futuros modelos predictivos de la calidad del aceite de oliva.

En resumen, los componentes de rendimiento (peso seco y contenido de aceite) mostraron tendencia a disminuir con el aumento de la temperatura media, mientras que la proporción de aceite estuvo explicada en mayor medida por la amplitud térmica. La variación en la proporción del ácido oleico estuvo asociada en mayor grado con la temperatura mínima. Esto es parcialmente consistente con lo informado para otras especies oleaginosas como girasol pero, llamativamente, la variación en la proporción de oleico en función de la temperatura mínima fue opuesta a la registrada en ese cultivo anual. Adicionalmente se incluyó a la amplitud térmica como motriz candidata, mostrando que es una variable que explica con robustez los cambios en la proporción de los ácidos oleico, linoleico y linolénico en el aceite de oliva. Esta variable ambiental no había sido estudiada en olivo a escala ecofisiológica y ni a nivel del metabolismo de los ácidos grasos. Futuros estudios manipulativos de la temperatura que independicen la amplitud térmica de la temperatura mínima permitirán entender y comparar los efectos de estas variables predictoras sobre los cambios en la proporción de ácidos grasos en el aceite de oliva. La información generada en este trabajo permitió acotar la identidad de las variables motrices candidatas que tuvieron impacto sobre variables productivas (peso seco, contenido y concentración de aceite) y de calidad (proporción de ácidos grasos) del aceite de oliva. Esto contribuirá a establecer criterios para la selección de sitios de plantación con temperaturas que maximicen las variables aquí estudiadas y permitirá incluir a la temperatura en el diseño de modelos predictivos del rendimiento.

Hasta aquí, en los tres capítulos de resultados de esta tesis, se informaron los resultados de los experimentos realizados. En el próximo capítulo (final) se plantearán y discutirán los mensajes más relevantes de la investigación en su conjunto, en el marco de los objetivos inicialmente planteados y se expondrán los nuevos interrogantes que emergieron a partir de los resultados.

Capítulo V

Discusión general

Capítulo V

Discusión general

La temperatura es un factor ambiental que no puede ser modificado por el hombre una vez implantado el cultivo. Por otra parte las temperaturas se están incrementando como consecuencia del cambio climático (IPCC, 2013). Este factor nunca había sido estudiado de manera manipulativa en olivo ni en otras oleaginosas (como palta y palma aceitera) que acumulan aceite principalmente en el mesocarpio, probablemente debido a la dificultad que implica realizar estudios de larga duración (el período de acumulación de aceite se extiende entre 4 y 6 meses) con árboles. La bibliografía disponible para olivo solamente incluye estudios de correlación en los que se asocia las variables productivas (Trentacoste et al., 2012 y Rondanini et al., 2014) o de calidad de aceite con temperaturas estacionales (Mailer et al., 2010; Ceci y Carelli, 2010; Rondanini et al., 2011; Lombardo et al., 2008; Orlandi et al., 2012). En este contexto, los experimentos realizados para esta tesis fueron novedosos en tanto permitieron, mediante ensayos manipulativos, explorar el efecto de la temperatura media durante el período de crecimiento del fruto sobre el peso seco y su concentración de aceite (variables productivas) y sobre las proporciones de los ácidos grasos presentes en el aceite (variables vinculadas a la calidad del aceite).

Los sistemas de calentamiento y enfriamiento diseñados y aplicados en los experimentos de este trabajo permitieron generar amplios rangos térmicos durante el crecimiento del fruto sobre plantas creciendo a campo. El uso de cámaras que encierran ramas de árboles creciendo a campo permitió implementar varios niveles térmicos y así para poder evaluar las funciones respuesta de los varios parámetros de producción y calidad analizados bajo las condiciones normales de una plantación comercial. Los tratamientos impusieron aumentos y disminuciones respecto de las oscilaciones diarias (Figs. 2.2, 3.2 y 4.1) y estacionales de temperatura (Figs. 2.1 y 3.1), excepto en el tratamiento de calentamiento nocturno en el que el objetivo específico fue aumentar la temperatura nocturna (Fig. 4.1). Aunque el volumen de las cajas fue limitado permitió colocar ramas con frutos, y los resultados fueron robustos y consistentes entre experimentos comparables (por ejemplo la respuesta de los ácidos grasos en período B en el Cap. III (Figs. 3.6. b, 3.7.b, d) y temperatura media en el Cap. IV (Fig. 4.6)) y también con lo observado en estudios de correlación (Rondanini et al., 2014). A su vez, resultados de un experimento complementario demostraron que las cámaras usadas no generaron un efecto sobre las variables analizadas más allá del asociado al incremento en la temperatura (Cuadro 2.2). El momento de aplicación de los tratamientos fue distinto en las tres temporadas experimentales en función de poner a prueba las hipótesis y alcanzar los objetivos propuestos.

El peso seco del fruto es una variable de relevancia agronómica ya que es uno de los componentes de rendimiento. Los mensajes más claros sobre este parámetro surgieron al realizar el experimento de larga duración (Cap. II), donde el sistema

experimental permitió generar un amplio rango de temperaturas medias (16-32°C). El peso seco del fruto se mantuvo estable entre 16-25°C, mientras que temperaturas mayores provocaron disminuciones del mismo (Fig. 1.4. a). Esta información permite aceptar parcialmente la *Hipótesis 1.1. El incremento en la temperatura media diaria durante el crecimiento del fruto afecta negativamente el peso seco del fruto*, ya que el peso seco sólo se afectó si la temperatura media fue >25°C. Estos resultados complementan lo conocido hasta el momento por estudios correlativos que compararon el comportamiento del fruto entre zonas o años con distintas temperaturas medias. Por ejemplo, Trentacoste et al. (2012) no encontraron variaciones en el peso fresco del fruto al analizar el rango térmico entre 18.8-19.7°C, intervalo mucho más estrecho que los 16- 25° C alcanzados en el presente trabajo, dentro del cuál tampoco observaron respuestas en ésta variable. Rondanini et al. (2014) informaron la tasa y duración del crecimiento de frutos de olivo registradas en dos temporadas de crecimiento, en distintos regímenes térmicos de Argentina, cubriendo un gradiente de temperaturas de entre 23-27 °C. Dicho trabajo mostró que las variaciones en el peso seco del fruto estuvieron mejor explicadas por la tasa que por la duración del período de crecimiento. Sin embargo no se encontró relación entre la temperatura media y la tasa de crecimiento del fruto. La información aportada por esta tesis y la información disponible hasta el momento en la literatura no basta para explicar la variación en el peso seco del fruto con la temperatura en todas sus dimensiones. Así, las cámaras utilizadas en estos experimentos contuvieron 2 ramas con 8- 10 frutos cada una, fruta suficiente para análisis a cosecha final, pero no para realizar cosechas intermedias que permitieran calcular la tasa de crecimiento y la duración del período de crecimiento. El diseño de futuros experimentos que incluyan el estudio de estas variables en función de la temperatura ayudará a explicar las respuestas observadas hasta el momento. Los experimentos deberán contemplar cosechas intermedias sucesivas que permitan el seguimiento de la tasa y de la duración del crecimiento de frutos creciendo a distintas temperaturas. Será importante realizar investigaciones sobre árboles enteros de manera de contar con un alto número de frutos donde se altere lo menos posible la relación fuente/destino con las cosechas sucesivas en el tiempo. Además permitirá estudiar si hay cambios en la partición de carbono (entre los frutos y el resto de la biomasa del árbol) con los cambios en la temperatura. Respecto al rango térmico a explorar, sería interesante contar con temperaturas menores a 25°C (que no generaron cambios en el peso final, Fig. 2.4. a), permitiendo así detectar si existen compensaciones entre la tasa y la duración del crecimiento del fruto con respecto a temperaturas superiores a los 25°C, que produjeron la disminución del peso seco del fruto (Fig. 2.4. a).

La concentración de aceite, tanto en mesocarpio, en semilla y en fruto entero, tuvo respuestas consistentes en todos los experimentos, siguiendo un patrón de disminución lineal al aumentar la temperatura media (Figs. 2.4, 3.4 c, d y 3.5 c, d). Esto permite aceptar la *Hipótesis 1.2. Aumentos en la temperatura media del aire durante el crecimiento del fruto provoca disminución en el porcentaje de aceite a madurez fisiológica*. Estos resultados reforzaron las evidencias surgidas de trabajos de correlación entre las temperaturas medias de distintos sitios y años que indicaron que la

concentración de aceite está negativamente asociada a la temperatura media (Rondanini et al., 2014). Los resultados de los presentes experimentos permitieron el estudio de la respuesta del porcentaje de aceite a dimensiones del régimen térmico hasta ahora no exploradas. Así, las relaciones entre la concentración de aceite y distintas variables motrices (temperatura máxima, mínima, media y amplitud térmica) pusieron de manifiesto que la temperatura media, la máxima y la amplitud térmica fueron las que estuvieron asociadas a los cambios en la proporción de aceite del fruto (Fig. 4.3). Se detectó que es la amplitud térmica la que mejor explica los cambios en el porcentaje de aceite del fruto, seguida por la temperatura máxima (Fig. 4.3. b y c). Tanto el contenido de aceite como el peso seco por fruto disminuyeron al aumentar la temperatura (Fig. 4.2). Sin embargo, de estas dos variables, la disminución del peso seco fue mayor provocando un aumento en la concentración de aceite en el fruto. Estos cambios en la concentración de aceite podrían estar vinculados con cambios en la tasa de acumulación o la duración del período de la acumulación de aceite. Hasta el momento se conocían indicios de una correlación negativa entre la duración del período de acumulación de aceite y la temperatura máxima (Trentacoste et al., 2012), basados en las diferencias térmicas entre dos estaciones de crecimiento del fruto donde otras condiciones ambientales, además de la temperatura, también variaron. Respecto a la tasa de acumulación de aceite todavía no se conoce la respuesta. Conocer las respuestas de la tasa y la duración del período de acumulación de aceite será importante para entender la respuesta del porcentaje de aceite informado en esta tesis. Nuevos experimentos manipulativos de la temperatura que abarquen un amplio rango térmico, darían información más precisa sobre el efecto de la temperatura que la obtenida a partir de trabajos de correlación donde otros factores ambientales varían simultáneamente. Los futuros experimentos deberán incluir, al igual que lo indicado en el párrafo previo, cosechas sucesivas de frutos a lo largo de la estación de crecimiento. Los tratamientos térmicos deberán realizarse sobre plantas enteras y durante todo el período de crecimiento del fruto.

Algunos cambios en la proporciones de ácidos grasos del aceite pudieron ser explicados satisfactoriamente por las variaciones en la temperatura. El principal ácido graso del aceite de oliva es el ácido oleico (entre el 55-83% para que el aceite califique en la categoría extra virgen [COI, 2013]). Los aceites provenientes de las zonas más cálidas de Argentina como Catamarca y La Rioja muestran valores por debajo del límite inferior aceptado para su comercialización (Ceci y Carelli 2010, Rondanini et al., 2007). Los experimentos manipulativos de la temperatura realizados en esta tesis demostraron que la temperatura provoca cambios en la proporción de los ácidos grasos del aceite. Así, los resultados obtenidos luego del calentamiento de frutos de olivo en crecimiento por períodos prolongados permiten aceptar la Hipótesis 1.3. que enunciaba *Aumentos en la temperatura media del aire durante el crecimiento del fruto, resultan en variaciones en el porcentaje de los principales ácidos grasos que componen el aceite de oliva*. Los cambios más importantes se observaron en la proporción de oleico que disminuyó $0.69\ \%^{\circ}\text{C}^{-1}$, con una caída de 11 puntos porcentuales entre los extremos térmicos aunque no traspasó el límite inferior propuesto por COI de 55% (Fig. 2.5. a).

Otro ácido graso monoinsaturado pero presente en menor proporción, el ácido palmitoleico, aumentó $0.05\%^{\circ}\text{C}^{-1}$ con el incremento de la temperatura. De manera complementaria al ácido oleico, la proporción de ácido linoleico, ácido graso obtenido a partir de oleico por la acción de enzimas desaturasas, aumentó $0.3\%^{\circ}\text{C}^{-1}$. La proporción del ácido linolénico que continúa en la ruta de insaturación de los ácidos grasos de 18 carbonos, también aumentó $0.05\%^{\circ}\text{C}^{-1}$. Si bien esta tasa de aumento fue baja, a temperaturas medias $>20^{\circ}\text{C}$ superó el límite establecido por la norma COI ($<1\%$) para ácido linolénico (Fig. 2.5. c). Las proporciones de los ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) tuvieron patrones distintos entre sí. El palmítico, ácido graso de 16 carbonos y precursor del resto de los ácidos grasos analizados en este trabajo, aumentó al incrementarse la temperatura (Fig. 2.5 b). En tanto el ácido esteárico, precursor del ácido oleico, fue el único que se mantuvo estable en todo el rango térmico (Fig. 2.5. d). Este es el primer trabajo en oleaginosas en analizar la relación funcional entre un grupo numeroso de ácidos grasos (palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico) y la temperatura. En particular, para oleaginosas que acumulan aceite en mesocarpo, es el primer estudio en describir la relación funcional entre la proporción de ácidos grasos y la temperatura mediante experimentos manipulativos. Los resultados pusieron en evidencia que la temperatura modula la proporción de varios ácidos grasos del aceite de oliva. Cuando los tratamientos se aplicaron por lapsos más cortos (70 y 75 días; Cap. III y IV respectivamente), en períodos tardíos del crecimiento del fruto, los patrones resultantes fueron consistentes con los informados para el tratamiento de larga duración (comparar Fig. 2.5. con Figs. 3.6. b, 3.7 b y d y 4.6). La consistencia de los patrones de respuesta de la proporción de ácidos grasos al analizar aceite de fruto entero ó de mesocarpo refuerza la confianza en los resultados obtenidos en el Capítulo II.

Las variaciones de los patrones de ácidos grasos con la temperatura, observadas en trabajos donde se correlacionó la proporción de oleico y la temperatura media de distintas localidades y años, ó aquellas encontradas en esta tesis, mediante experimentos manipulativos de la temperatura, fueron asimismo consistentes. Los cambios producidos por la temperatura podrían estar relacionados a cambios a nivel enzimático. Si bien la enzima oleato desaturasa es la única enzima de la ruta de síntesis de ácidos grasos sobre la que se estudió el efecto de la temperatura en olivo, en esta tesis se puso en evidencia que otras enzimas de dicha vía metabólica estarían variando, ya que la relación oleico: linoleico es distinta a 1:1. A escala molecular se ha estudiado el nivel de expresión de genes (FAD2-1 y FAD 2-2) que codifican para la enzima oleato desaturasa, (Hernández et al., 2011). En este trabajo se expusieron ramas fructíferas separadas del árbol a condiciones de alta temperatura (pasaron de 25°C a 35°C) durante 24h. Los resultados mostraron que los niveles de expresión de las FADs disminuyeron al aumentar la temperatura, pero no encontraron variaciones en la proporción de los ácidos oleico y linoleico en el aceite. Estos resultados a escala molecular no se corresponden con lo observado en estudios a escala ecofisiológica como los de la presente tesis. Nuevos experimentos que combinen las dos escalas permitirán integrar y entender los mecanismos que generaron las respuestas informadas en esta tesis. Serán

necesarios experimentos que manipulen la temperatura de los frutos a campo por períodos prolongados. Además, sería deseable lograr que los muestreos para medir el nivel de expresión de FAD2 coincidan con el período del crecimiento del fruto en la que hay expresión del gen, por ejemplo, a partir de las 28 semanas después de floración (Banilas et al., 2005 y Hernández et al., 2009).

Un hallazgo sumamente importante del experimento descrito en el Cap. III es aquél que indica que los ácidos grasos en el aceite de semilla de olivo muestran patrones de respuesta a la temperatura distintos al hallado para mesocarpio o para fruto entero y similares a los informados para oleaginosas de semilla como el girasol o soja (Izquierdo et al., 2006, Zuñil et al., 2012). En el fruto del olivo, luego del cuaje, la semilla y el mesocarpio crecen simultáneamente, aunque el crecimiento de la semilla finaliza días después de la esclerificación del endocarpio, y aquél del mesocarpio se extiende por aproximadamente 3 meses más (Fig.3.3). El efecto de la temperatura observado en el período temprano en el que el crecimiento de los dos órganos es simultáneo, mostró claramente que los patrones de cambio en las proporciones de aceite fueron distintos. Mientras que la proporción de ácido oleico en mesocarpio disminuyó (Fig. 3.6. a) con el aumento de la temperatura media, en el aceite de semilla aumentó (Fig.3.6. c). La respuesta observada en la semilla de olivo fue consistente con lo conocido en oleaginosas de semilla como girasol, soja o maíz (Zuñil, et al., 2012). Esto permite aceptar la Hipótesis 2.1. que enunciaba *Aumentos en la temperatura media durante períodos tempranos del desarrollo del fruto provoca incrementos en el porcentaje de ácido oleico del aceite sintetizado en semilla, mientras que en el aceite de mesocarpio la proporción del mismo disminuye*. El estudio puso de manifiesto que la respuesta de los patrones de concentración de ácidos grasos del aceite a la temperatura son distintos entre órganos. No se encontraron en la literatura estudios sobre la respuesta a la temperatura realizados en especies que acumulan aceite principalmente en mesocarpio, como palma aceitera o palta. Sería sumamente importante emprender investigaciones que estudien el efecto de la temperatura en dichas especies, para determinar si en las mismas se repiten las respuestas contrastantes entre mesocarpio y semilla o si lo observado en los presentes experimentos es una particularidad del olivo.

Este trabajo exploró distintas dimensiones del régimen térmico como motrices candidatas para explicar los cambios en la proporción de ácidos grasos del aceite de oliva (Fig.4.4). Este análisis mostró que la temperatura mínima es la que mejor explica los cambios en la proporción de oleico (Fig. 4.5. c), similar a lo ya conocido para girasol (Izquierdo y Aguirrezábal, 2008), pero con una diferencia sumamente importante: la respuesta de dicha especie tiene signo opuesto. Mientras que en girasol la proporción de oleico se incrementó al aumentar la temperatura mínima, en olivo disminuyó. Estos resultados justifican la aceptación parcial de la Hipótesis 3.1. *La composición ácida del aceite se vería afectada por el incremento de la temperatura mínima nocturna exploradas durante el crecimiento del fruto; a mayor temperatura, menor porcentaje de ácido oleico y mayor de linoleico y palmítico*. El descenso en la proporción de ácido oleico con el aumento de la temperatura mínima se dio conjuntamente con el aumento en la proporción de linoleico (Fig. 4.5. c y d); la

proporción de palmítico tuvo una tendencia a incrementarse pero la pendiente no fue significativa (Fig. 4.5. a). Esta tendencia fue consistente a lo observado en los Cap. II y Cap. III donde se observaron aumentos significativos del ácido palmítico al incrementarse la temperatura (Figs. 3.7. b y 2.5. b).

Este trabajo identificó a la temperatura mínima y a la amplitud térmica como variables de alto valor predictivo de la proporción de oleico y linoleico en el aceite de fruto entero; siendo éste el primer trabajo para olivo en estudiar el efecto de estas variables. En particular, la amplitud térmica es una variable poco explorada, sólo se encontró un trabajo en vid donde se manipuló dicha variable (Cohen et al., 2008). Dicho trabajo identificó cambios en el grado de polimerización de las proantocianidinas, compuesto relacionados a la calidad del vino, en respuesta a la amplitud térmica diaria, aunque las vías metabólicas de síntesis de proantocianidinas en vid y la de ácidos grasos en olivo son distintas. En el caso de la temperatura mínima hay estudios en olivo que utilizaron datos colectados de estaciones meteorológicas de distintas zonas encontrando correlación entre la proporción de algunos ácidos grasos y la temperatura mínima (Orlandi et al., 2012). El antecedente más fuerte se había encontrado en girasol como se había mencionado más arriba. Hay que destacar que la temperatura mínima y la amplitud térmica co-varían; por ello nuevos trabajos que permitan independizar el efecto de estas variables permitirán identificar la que mejor explique los cambios en la proporción de ácidos grasos en olivo e incorporarla a modelos predictivos de calidad de aceite. Por ejemplo, una manera de independizar estas dos variables sería con experimentos que mantengan constante la amplitud térmica y se varíe la temperatura mínima.

En conclusión, esta tesis realizó aportes importantes al conocimiento de la ecofisiología de un cultivo oleaginoso que acumula aceite principalmente en mesocarpo puesto que:

- Las relaciones funcionales entre variables productivas (peso seco y concentración de aceite) y de calidad de aceite (proporción de ácidos grasos), y la temperatura sobre amplios rangos, considerando todos los experimentos se abarco un rango entre 15-32 °C, algo que contrasta con los rangos más estrechos explorados en estudios de correlación.
- Los cambios en la proporción de los ácidos grasos en función de la temperatura. Siendo el estudio más completo respecto al número de ácidos grasos analizados (palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico) realizado en oleaginosas.
- Puso de manifiesto diferentes comportamientos frente a la temperatura en la proporción de ácidos grasos de los aceites de semilla y mesocarpo de olivo.
- Encontró similitudes en las respuestas en semilla de olivo y las conocidas para especies oleaginosas de semilla como girasol.

- Permitió evaluar las distintas dimensiones del régimen térmico, acotando las que mejor se asociaron con los cambios en el peso seco del fruto, la proporción de aceite y las proporciones de ácidos grasos. De este análisis surgió la amplitud térmica, nunca antes estudiada en olivo y muy poco estudiada en general, como posible variable predictora de los cambios en la proporción de los ácidos oleico, linoleico y linolénico en el aceite de oliva.

Por último, los resultados obtenidos en los experimentos conducidos para esta tesis pusieron en evidencia que los desajustes a la normativa COI respecto a lo encontrado en los aceites provenientes de las regiones cálidas del NOA argentino podrían explicarse por las mayores temperaturas durante la fase de síntesis de aceite. Además, desde el punto de vista de la planificación de la producción olivícola, los resultados de esta tesis pueden constituir criterios para la selección de sitios de plantación de nuevos olivares basados en los registros térmicos de cada zona. Las relaciones funcionales entre las variables respuesta y la temperatura podrían incorporarse en modelos de simulación del rendimiento y calidad que se desarrollen en el futuro. Respecto a la tendencia del aumento de la temperatura como consecuencia del calentamiento global, este trabajo mostró el impacto negativo que tendrá tanto a nivel productivo como a nivel de la calidad del aceite de oliva. Finalmente, los resultados presentados en esta tesis generaron nuevos interrogantes que se acompañaron con propuestas de nuevos experimentos que darán lugar a futuras líneas de investigación.

Referencias Bibliográficas

- Alexander L., Zhang, X., Peterson C., Caesar J., Gleason B., Klein A., Haylock Collins D., Trewin B., Rahimzadeh F., Tagipour A., Rupa Kumar, Ravadekar J., Griffiths G., Vincent L., Stephenson D., Burn J., Aguilar E., Brunet M., Taylor M., New M., Zhai P., Rusticucci M., Vazquez-Aguirre J. 2006. Global observed changes in daily climate change extremes of temperature and precipitation. *Journal Geophysical Research*. Vol 111 DO 5109.
- Atkinson C., Taylor L., Taylor J., Lucas A., 1998. Temperature and irrigation effects on the cropping, development and quality of 'Cox's Orange Pippin' and 'Queen Cox' apples. *Scientia Horticulturae* 75. 59-81.
- Banilas G., Moressis A., Nikoloudakis N., Hatzopoulos P. 2005. Spatial and temporal expressions of two distinct oleate desaturases from olive (*Olea europaea* L.). *Plant Science* 168. 547-555.
- Barranco D., Cimato A., Fiorino P., Rallo L., Touzani A., Castañeda C., Serafín F., Trujillo I. 2000. World catalogue of olive varieties. Consejo Oleícola Internacional, Madrid, España.
- Beltrán G., Uceda M., Hermoso M., Frías L. 2008. Capítulo 6 Maduración. En. *El cultivo del Olivo* Ed. Barranco, D, Fernández- Escobar, R. y Rallo L. 6ª Edición. Mundi prensa- Madrid
- Beltrán, G., del Rio, C., Sánchez, S., Martínez, L. 2004. Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 52. 3434-3440.
- Bongi G. y Long S. 1987. Light-dependent damage to photosynthesis in olive leaves during chilling and high temperature stress. *Plant, Cell and Environment*, 10. 241-249.
- Canvin D. 1965. The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of the oils from several oil seed crops. *Canadian Journal of Botany* 43. 63-69.
- Ceci L., Carelli A. 2010. Compositional data review of monovarietal Argentinian olive oils. *Advances in fats and oil Research*. 71- 97. ISBN: 978- 81- 7895-472-1.
- Cherbiy- Hoffmann S., Hall A., Rousseaux MC. 2013. Fruit, yield and vegetative growth responses to photosynthetically active radiation during oil synthesis in olive trees. *Scientia Horticulturae*. 150. 110-116.

- Cherbiy-Hoffmann S., Searles P., Hall A., Rousseaux MC. 2012. Influence of light environment on yield determinants and components in large olive hedgerows following mechanical pruning in the subtropics of the southern hemisphere. *Scientia Horticulturae*. 137. 36-42.
- Chimenti C., Hall A., López M. 2001 Embryo-growth rate and duration in sunflower as affected by temperature. *Field Crops Research*. 69.81-88.
- Chowdhury S. y Wardlaw I. 1978. The effect of temperature on kernel development in cereals. *Australian Journal of Agricultural Research* 29. 205-223
- Cohen S., Tarara J., Kennedy J. 2008. Assing the impact of temperatura on grape phenolic metabolism. *Analitica Chemica Acta* 621. 57-67.
- Conde C., Delrot S., Gerós H. 2008. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology* 165. 1545-1562.
- Consejo Oleicola Internacional (Noviembre, 2011) Informe sobre la producción mundial de aceite de oliva.
<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>
- Dabbou S., Chehab H., Faten B., Dabbou S., Esposto S., Selvaggini R., Taticchi A., Servili M., Montedoro G., Hammami M. 2010. Effect of tree irrigation regimes on Arbequina olive oil produced under Tunisian growing conditions. *Agricultural Water Management* 97. 763-768.
- Daymond A. y Hadley P. 2008. Differential effects of temperature on fruit development and bean quality of contrasting genotypes of cacao (*Theobroma cacao*). *Annals Applied Biology* 153. 175-185.
- Dodd A., Salanthia N., Hall A., Kevei E., Toth R., Nagy F., Hibberd J., Millar A., Webb A. 2005. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival and competitive advantage. *Science* 309. 630-633
- Egli D., Wardlaw I. 1980. Temperature response of seed growth characteristics of soybeans. *Agronomy Journal* 72. 560-564.
- Garcés R. y Mancha M. 1993. One- step extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Analytical Biochem*. 211. 139- 143.
- García-Inza, GP. 2010. Variación en la composición de ácidos grasos y contenido de aceite en *Olea europea* L. var. Arauco por efecto de la temperatura durante el crecimiento del fruto. Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo de la Facultad de Agronomía de la UBA
- García-Inza GP., Castro D., Hall A., Rousseaux MC. 2014. Responses to temperature of fruit dry weight, oil concentration, and fatty acid

- composition in olive (*Olea europaea* L. var. Arauco). *European Journal of Agronomy*. 54. 107-115.
- Gibson L. y Mullen. 1996. Soybean seed composition under high day and night growth temperatures. *Journal of the American Oil Chemists Society* 73. 733-737.
- Gomez del Campo M., Morales-Sillero, A., Vita Serman F., Rousseaux M., Searles P. 2010. El olivar en los valles áridos del Noroeste de Argentina (provincias de Catamarca, La Rioja y San Juan). *Olivae* 14. 23-45.
- Hammami S., Manrique T., Rapoport H. 2011. Cultivar-based fruit size in olive on different tissue and celular processes throughout growth. *Scientia Horticulturae*. 130. 445-451.
- Hansen J., Sato M., Ruedy R. 2012. Perception of climate change. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America*. 109. 2415-2423.
- Haralampidis K., Milioni D., Sánchez J., Balrusch M., Heinz e., Hatzopoulos P. 1998. Temporal and transient expression of stearyl-ACP carrier protein desaturase gene during olive fruit development. *Journal of Experimental Botany*. 327. 1661-1669.
- Harris H., McWilliam y Mason, W. 1978. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. *Australian Journal of Agricultural Research*. 29. 1203-12.
- Hernández M., Padilla M., Mancha M., Martínez –Rivas J. 2009. Expression analysis identifies FAD2-2 as the olive oleate desaturase gene mainly responsable for the linoleic acid content in virgin olive oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 57. 6199-6206.
- Hernández M., Padilla M., Sicardo M., Mancha M., Martinez Rivas J. 2011. Effect of different environmental stresses on the expression of oleate desaturase genes and fatty acid composition in olive fruit. *Phytochemistry* 72. 178-187.
- Hilditch T. y Williams P. 1964. *The chemical constitution of natural fats*. Chapman y Hall, London., 1964.
- INTA 2014. Informe especial de condiciones de temperatura en La Rioja (Capital). Informe especial del área de Agrometeorología del Instituto de Clima y Agua del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- International Olive Council (COI). 2013. Revising the trade Standard applying to olive oils and olive-pomance oils. Decision No DEC-20/100- V/2013. COI T.15. No 3, Rev. 7.

- IPCC 2013. Grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático. Cambio climático, bases físicas, resumen para responsables de políticas. www.climatechange2013.org
- IUPAC 1992. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 1st supplement to the 7th edition, international Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC (Ed.) Pergamon Press. Oxford, England.
- Izquierdo N., Aguirrezábal L., Andrade F., Cantero M. 2006. Modeling the response of fatty acid composition to temperature in a traditional sunflower hybrid. *Agronomy Journal* 98. 451-461.
- Izquierdo N. y Aguirrezábal L. 2008. Genetic variability in the response of fatty acid composition to minimum night temperature during grain filling in sunflower. *Field Crops Research* 106. 116-125.
- Izquierdo, N., Aguirrezábal A., Andrade, F., Pereyra. 2002. Night temperature affects fatty acid composition in sunflower oil depending on the hybrid and the phenological stage. *Field Crops Research*. 77. 115-126.
- Izquierdo, N., Aguirrezábal A., Martínez-Force E., Garcés R., Paccapelo V., Andrade F., Reid R., Zambelli A. 2013. Effect of growth temperature on the high stearic and high stearic-high oleic sunflower traits. *Crop and Pasture Science*. 64. 18-25.
- Kabbaj A., Abbott A., Berville A. 1996. Expression of stearate, oleate and linoleate desaturase genes in sunflower with normal and high-oleic contents. *Helia* 19. 1-17.
- Kenkel N., Derksen D., Thomas A., Watson P. 2002. Review: Multivariate analysis in weed science research. *Weed Science* 50. 281-292.
- Lombardo N., Marone E., Alessandrino M., Godino G., Madeo A., Fiorino P. 2008. Influence of growing season temperature in fatty acids (Fas) of triacylglycerols (TAGs) composition in Italian cultivars of *Olea europea*. *Advances in Horticultural Science*. 22. 49-53.
- Loomis R. y Connor D. 2002. Capítulo 11 Respiración y reparto de asimilados. *Ecología de cultivos, productividad y manejo en sistemas agrarios*. Mundi prensa- Barcelona
- Maestri D., Labuckas D., Mireles J., Lamarque A., Zygaldó J., Guzmán C. 1998. Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77. 494-498.

- Mailer R., Ayton J., Graham K. 2010. The influence of growing region, cultivar and harvest timing on the diversity of Australian olive oil. *Journal of the American Chemical Society*. 87. 877-884.
- Mailer, R. 2005. Variation in oil quality and fatty acid composition in Australian olive oil. *Australian Journal Experimental Agriculture*. 45. 115-119.
- Mannina L., Fontanazza, G., Patumi, M., Ansanelli, G., Segre A. 2001. Italian and Argentine olive oils: a NMR and gas chromatographic study. *Grasas y Aceites*. 52. 380-388
- Martínez-Force E., Álvarez-Ortega R., Cantisán S., Garcés R. 1998. Fatty acid composition in developing high saturated sunflower (*Helianthus annuus*. L) seeds: maturation changes and temperature effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46. 3577-3582.
- Matteucci M., D'Angeli S., Errico S., Lamanna R., Perrotta G., Altamura M. 2011 Cold affects the transcription of fatty acid desaturases and oil quality in the fruit of *Olea europaea* L. genotypes with different cold hardiness. *Journal of Experimental Botany* 62. 3403-3420
- Moriana, A., Orgaz, F., Pastor, M., Fereres E. 2003. Yield responses of a mature olive orchard to water deficits. *Journal of American Horticultural Society Science* 128. 425-431.
- Ollivier D., Artaud J., Pinatel C., Durbec J., Guerere M. 2003. Triacylglycerol and fatty acid composition of french virgin olive oils. Characterization by chemometrics. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51. 5723-5731.
- Orlandi F., Bonofiglio T., Romano B., Fornaciari M. 2012. Qualitative and quantitative aspects of olive production in relation to climate in southern Italy. *Scientia Horticulturae* 138. 151-158.
- Pérez-López D., Ribas F., Moriana A., Rapoport H y De Juan A. 2008. Influence of temperature on the growth and development of olive (*Olea europea* L.) trees. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 83. 171-176
- Pereyra-Irujo G. y Aguirrezábal L., 2007. Sunflower yield and oil quality interactions and variability: analysis through a simple simulation model. *Agricultural and Forest Meteorology*. 143. 252-265.
- Pleite R., Rondanini D., Garcés R., Martínez Force E. 2008. Day/night variation in fatty acids and lipids biosynthesis in sunflower (*Helianthus annuus* L) seeds. *Crop Science*. 48. 2952-1957.

- Ploschuk E. y Hall A. 1997. Maintenance respiration coefficient for sunflower grains is less than that for entire capitulum. *Field Crops Research* 49. 147-157.
- Poghosyan Z., Haralampidis K., Martsinkovskaya A., Murphy D., Hatzopoulos P. 1999. Developmental regulation and spatial expression of a plastidial fatty acid desaturase from *Olea europaea*. *Plant Physiology and Biochemistry* 37. 109-119.
- Proietti P. 2003. Changes in Photosynthesis and fruit characteristics in olive in response to assimilate availability. *Photosynthetica* 41. 559-564.
- Radler F. 1965. The effect of temperature on the ripening of sultana grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 16. 38-41.
- Ramli U., Baker D., Quanti P., Hardwood J. 2002. Control mechanisms operating for lipid biosynthesis differ in oil-palm (*Elaeis guineensis* Jacq) and olive (*Olea europaea* L.) callus cultures. *Biochemistry journal* 364. 385-391.
- Ranalli A., Tombesi A., Ferrante ML., De Mattia G. 1998. Respiratory rate of olive drupes during their ripening cycle and quality of oil extracted. *Journal Science Food Agriculture* 77. 359-367.
- Rapoport H., Gómez del Campo M. 2008. Descripción de la iniciación floral, floración, cuajada, caída de frutos y endurecimiento del hueso. *Agricultura* 907. 400-406.
- Ravetti L., Matías C. 1999. Caracterización preliminar de variedades y aceites de oliva vírgenes de la provincia de Catamarca. *Aceites y Grasas* 36. 361-369.
- Rolletschek H., Borisjuk L., Sánchez-García A., Gotor C., Romero L., Martínez-Rivas y Manuel Mancha. 2007. Temperature-dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Journal of Experimental Botany* 58. 3171-3181.
- Rondanini D., Castro D., Searles P., Rousseaux C. 2011. Fatty acid profiles of varietal virgin olive oils (*Olea europaea* L.) from mature orchards in warm arid valleys of northwestern Argentina (La Rioja). *Grasas y Aceites* 62. 399-409.
- Rondanini D., Castro D., Searles P., Rousseaux C. 2014. Contrasting patterns of fatty acid composition and oil accumulation during fruit growth in several olive varieties and locations in a non-Mediterranean region. *European Journal of Agronomy* 52. 237-246.

- Rondanini D., Ruiz D., Del Carril D., Araujo S., García E., Rousseaux M.C. 2007. Caracterización de los aceites varietales de oliva virgen elaborados en los valles cálidos de la La Rioja (Argentina). Campañas 2005 y 2006. *Aceites & Grasas* 69. 654-659.
- Rondanini D., Castro D., Hall A., Rousseaux M. 2008. Constrasting patterns of oleic accumulation between olive cultivars growing in warm valleys of Argentina. The Sixth International Symposium on Olive Growing (ISHS). Evora, Portugal. 9-13 de Septiembre, pp. 89.
- Rondanini D., Mantese A., Savin R., y Hall, A. 2006. Responses of sunflower yield and grain quality to alternating day/night high temperature regimes during grain filling: effects of timing, duration and intensity of exposure to stress. *Field Crops Research* 96. 48-62.
- Rondanini, D., Savin, R., Hall, A. 2003. Dynamics of fruit growth and oil quality of sun flower (*Helianthus annuus* L.) exposed to brief intervals of high temperature during grain filling. *Field Crops Research*. 83. 79-90.
- Ross J., Sánchez J., Millan J., Murphy D. 1993. Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissues in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea Americana*). *Plant Science* 93. 203-210.
- Rugini E., Biasi R., Muleo R., 2000. Olive (*Olea europea* var *sativa*) transformation. In. S M Jain and S C Minocha (eds) *Molecular Biology of woody Plants*, vol 2 (pp 245-279).
- Sadras V. y Soar C. 2009. Shiraz vines maintain yield in response to 2-4 °C increase in maximum temperature using an open- top heating system at key phenostages. *European Journal of Agronomy* 31. 250-258
- Sadras V., Bubner R., Moran M. 2012. A large-scale, open-top system to increase temperature in realistic vineyard conditions. *Agricultural and Forest Meteorology* 154-155. 187-194.
- Salas J., Sánchez, J., Ramli U., Manaf A. 2000 Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Progress in Lipid Res.* 39. 151-180.
- Sarmiento C., Garcés R., Mancha M. 1998. Oleate desaturation and acyl turnover in sunflower (*Helianthus annus* L.) seed lipids during rapid temperature adaptation. *Planta* 205. 595-600.
- Seiler G. y Brothers M. 1999. Oil concentration and fatty acid composition of achenes of *Helianthus* species (Asteraceae) from Canada. *Economic Botany* 53. 273-280.

- Sofield I., Evans L., Cook M., Wardlaw I. 1977. Factors influencing the rate and duration of grain filling in wheat. *Aust.J. Plant Physiol.* 4. 785-797.
- Spayd S., Tarata J., Mee D., Fergusson J. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 53.3. 171-181
- Stark A., Madar Z. 2002. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutrition Review* 60. 170-176.
- Tous J., Romero A., 1994. Cultivar and location effects on olive oil quality in Catalonia (Spain). *Acta Horticulturae* 356. 323- 326.
- Tous J., Romero A., Plana J., Guerrero L., Díaz I., Hermoso J. 1997. Características químico-sensoriales de los aceites de oliva 'Arbequina' obtenidos en distintas zonas de España. *Grasas y Aceites*. 48. 415-424.
- Trápani N., López Pereira M., Sadras v.y Hall. 2003. Capítulo 10. Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en girasol. *Producción de granos*. Ed. Satorre, E.H, Benech-Arnold, R.L., Slafer, G.A., de la Fuente, E.B., Miralles, D.J. , Otegui, M.E. y Savin, R. Facultad de Agronomía: Buenos Aires. pp.203-241,
- Trentacoste E., Puertas C., Sadras V. 2012. Modelling the intraspecific variation in the dynamics of fruit growth, oil and water concentration in olive (*Olea europaea* L.). *European Journal of Agronomy* 38. 83-93.
- Tzen J., Lai Y., Chan K., Huang A. 1990. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species. *Plant Physiology* 94. 1282-1289.
- Uceda M.y Hermoso M. 2001. La calidad del aceite de oliva. In "El cultivo del olivo". (Eds Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L.). pp 589-614 (Junta de Andalucía-Ediciones Mundi-Prensa: Madrid)
- Uceda, M. y Frías, L., 1975. Harvest dates. Evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality. In *Proc. II Seminario Oleícola Internacional*. Ed. C. Oleícola. Internacional, Córdoba, Spain, pp 125–130.
- Villalobos, F., Testi L., Hidalgo J., Pastor M., Orgaz F. 2006. Modelling potential growth and yield of olive (*Olea europea* L.) canopies. *European Journal of Agronomy* 24. 296-303
- Wardlaw I., Blumenthal C., Larroque O., Wrigley C. 2002. Contrasting effects of chronic heat stress and heat shocks on kernel weight and flour quality in wheat. *Functional Plant Biology*. 29. 25-34.

- Wardlaw, I. y Moncur, L. 1995. The response of wheat of high temperature following anthesis. I The rate and duration of kernel filling. *Australian Journal of plant physiology* 22. 391-397.
- Warrington L., Fulton T., Halligan E., Silva H. 1999. Apple fruit growth and maturity are affected by early season temperatures. *Journal of Amererican Horticultural Society Science* 124. 468-477.
- Zuil S., Izquierdo N., Cantarero L., Aguirrezábal L. 2012. Oil quality of maize and soybean genotypes with increased oleica cid percentage as affected by intercepted solar radiation and temperature. *Field Crops Research* 127. 203-214.